

Matthias Bein

**Molekulare und immunelektronenmikroskopische
Untersuchungen zur Expression von sekretorischen
Aspartatproteinasen in einem *ex vivo* Modell der vaginalen
Kandidose und *in vivo***

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig

**Molekulare und immunelektronenmikroskopische
Untersuchungen zur Expression von sekretorischen
Aspartatproteinasen in einem *ex vivo* Modell der vaginalen
Kandidose und *in vivo***

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

vorgelegt von
Matthias Bein
aus
Wolfsburg
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. C. Korting
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Friese Prof. Dr. Dr. J. Heesemann Prof. Dr. W. Stolz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. M. Schaller
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	5. Juli 2005

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Candida albicans</i>	1
1.1.1	Taxonomische Stellung	1
1.1.2	Zusammensetzung und Struktur	2
1.1.3	Morphogenese	3
1.1.4	Lokale Infektionen beim Menschen durch <i>C. albicans</i>	4
1.1.4.1	Kutane Infektion	5
1.1.4.2	Orale Infektion	5
1.1.4.3	Vaginale Infektion	5
1.1.5	Pharmakotherapie	6
1.1.6	Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>	9
1.1.7	Die sekretorischen Aspartatproteinasen von <i>C. albicans</i>	11
1.1.7.1	Struktur, biochemische Eigenschaften und Synthese	11
1.1.7.2	Bedeutung als Virulenzfaktoren	13
1.1.7.3	Die <i>SAP</i> -Genfamilie	14
1.1.7.4	Funktionen der Sap-Isoenzyme	16
1.2	Die menschliche Vaginalschleimhaut	17
1.2.1	Anatomie und Ultrastruktur	17
1.2.2	Funktion, Physiologie und Immunologie	18
1.2.3	Pathologie der Vaginitis	19
1.3	Proteinaseinhibitoren	20
1.4	Ziel der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	<i>Ex vivo</i> -Virulenzuntersuchungen zu den Sap von <i>C. albicans</i> .	22
2.1.1	<i>Ex vivo</i> -Vaginalschleimhautmodell	22
2.1.2	Synchronisation der Stämme	22
2.1.3	Verwendete <i>C. albicans</i> -Stämme	23
2.1.4	<i>Ex vivo</i> -Infektionsmodell	23
2.1.4.1	Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	24
2.1.4.2	Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und Proteinaseinhibitoren	24
2.1.4.3	Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und <i>Lactobacillus acidophilus</i>	25
2.1.4.4	Infektion mit den <i>SAP</i> -Nullmutanten $\Delta sap1$, $\Delta sap2$ und $\Delta sap4-6$	25
2.1.4.5	Infektion mit den $\Delta sap1$ - und $\Delta sap2$ -Revertanten	26
2.1.4.6	Exposition gegenüber den Enzymen Sap1 und Sap2	26
2.1.4.7	Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und PMN	26

2.1.5	Fixierung und Einbettung	27
2.1.6	Lichtmikroskopische Untersuchungen	28
2.1.7	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	28
2.1.8	Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen	29
2.1.9	<i>SAP</i> -Genexpressionsstudien mittels RT-PCR	30
2.1.9.1	RNA-Aufarbeitung	31
2.1.9.2	RT-Reaktion	33
2.1.9.3	PCR-Methode	34
2.1.9.4	cDNA-Ethidiumbromid-Gelelektrophorese	35
2.2	LDH-Test	35
2.3	Statistische Analysen	36
2.4	<i>Ex vivo</i> -Untersuchungen zur Zytokinexpression bei der vaginalen Candidose	36
2.5	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Expression der sekretorischen Aspartatproteinasen von <i>C. albicans</i>	38
2.6	Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von Sap2	38
2.6.1	Optimierte Struktur von Sap2 mit Pepstatin A	39
2.6.2	Modell-Struktur von Sap2 mit Ritonavir und einem anderen peptidartigen Proteinaseinhibitor	39
3	ERGEBNISSE	41
3.1	<i>Ex vivo</i> -Untersuchungen zur Bedeutung der Sap bei der vaginalen Candidose	41
3.1.1	Morphologie des nicht infizierten RHVE	41
3.1.2	Morphologie des RHVE nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	42
3.1.3	<i>SAP</i> -Genexpression nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	45
3.1.4	Immunelektronenmikroskopischer Sap-Antigennachweis	47
3.1.5	Morphologie des RHVE und <i>SAP</i> -Genexpressionsmuster nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und Proteinaseinhibitoren	49
3.1.6	Morphologie des RHVE nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und <i>Lactobacillus acidophilus</i>	53
3.1.7	Morphologie des RHVE nach Infektion mit der $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - und $\Delta sap4-6$ -Mutante	54
3.1.8	<i>SAP</i> -Genexpression nach Infektion mit der $\Delta sap1$ - und $\Delta sap2$ -Mutante	57
3.1.9	Morphologie des RHVE nach Infektion mit der $\Delta sap1$ - und $\Delta sap2$ -Revertante	58
3.1.10	Morphologie des RHVE nach Exposition gegenüber den Enzymen Sap1 und Sap2	59
3.1.11	Morphologie des RHVE nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und PMN	60

3.1.12	<i>SAP</i> -Genexpression nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und PMN	62
3.2	LDH-Test	62
3.3	Zytokinexpression nach Infektion mit dem <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	63
3.4	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Bedeutung der Sap bei der vaginalen Kandidose	65
3.5	Dreidimensionale Struktur von Sap2 mit Proteinaseinhibitoren	67
3.5.1	Optimierte Struktur von Sap2 mit Pepstatin A	69
3.5.2	Modellstruktur und Wechselwirkungen von Sap2 mit Ritonavir und Inh18	71
4	DISKUSSION	74
4.1	Das RHVE und seine Eignung für ein Vaginalkandidose- modell	74
4.2	Virulenzuntersuchungen am RHVE und Einfluss einzelner Sap	75
4.3	Wirksamkeit von Proteinaseinhibitoren gegen Sap	77
4.4	Wirtsantwort auf eine vaginale Infektion mit <i>C. albicans</i>	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	83
7	VERZEICHNIS DER TABELLEN	88
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	DANKSAGUNG	104
10	LEBENS LAUF	105
11	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	106

1 EINLEITUNG

1.1 *Candida albicans*

1.1.1 Taxonomische Stellung

Candida albicans (lat. *candidus*: glänzend weiß; *albicare*: weiß sein/werden) gehört wie alle Pilze zu den eukaryontischen Mikroorganismen. Da sie sich nur ungeschlechtlich vermehren können, werden sie der Klasse der Deuteromycetes zugeteilt, die auch als *Fungi imperfecti* bezeichnet werden. *Candida albicans* (*C. albicans*) gehört zur Familie der Cryptococcaceae. In dieser Familie finden sich eine Reihe humanpathogener Pilze wie beispielsweise die Gattung *Cryptococcus*, *Trichosporon* oder *Pityrosporum*. Die Gattung *Candida* umfasst etwa 150 Arten, von denen *C. albicans* am besten untersucht ist (70, 99, 100, 116).

Merkmale der Gattung *Candida* sind nach Meyer et al. (87):

- Vermehrung durch multilaterale Sprossung
- Keine sichtbare Karotinoid-Pigmentbildung
- Keine Asco-, Telio-, Balisto- oder Arthrosporen
- Assimilation von Inositol und Pseudomycelbildung

Innerhalb der Gattung *Candida* unterscheidet man die verschiedenen Arten aufgrund der morphologischen Unterschiede und physiologischen Eigenschaften, also aufgrund ihrer Fähigkeit, bestimmte organische Substanzen zu assimilieren. Zur Erstkultivierung wird meist Sabouraud-Glukose-Agar oder Kimmig-Agar verwendet. Eine Subkultivierung auf Reisagar dient zum Nachweis von Chlamydosporen, die bei den Hefen ausschließlich von *C. albicans* gebildet werden. Chlamydosporen sind Dauersporen, die das Überleben des Pilzes bei ungünstigen Bedingungen gewährleisten. Des Weiteren stehen Selektivmedien zur Identifizierung der unterschiedlichen *Candida*-Spezies zur Verfügung. Häufig enthalten diese Selektivagarzubereitungen Nährstoffe, die nur von bestimmten Pilzen abgebaut werden. Die unterschiedliche Assimilation und Fermentation der Nährstoffe führt zu einer pH-Wert-Änderung und durch die enthaltenen Farbindikatoren zu einer Umfärbung der Agarplatte (100, 150). *C. albicans* zeigt bei Gram-Färbung ein positives Verhalten. Bei systemischen Kandidosen können die verschiedenen *Candida*-Arten durch einen Cross-Agglutinationstest serologisch unterschieden werden. Der Nachweis gelingt aufgrund der unterschiedlichen Oberflächen-Polysaccharide bzw. *Tsuchiya-Faktoren* mit ihren unterschiedlichen Antigen-Eigenschaften. Heutzutage kann

auch durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein direkter genetischer Nachweis einzelner *Candida*-Spezies erfolgen (44, 149).

1.1.2 Zusammensetzung und Struktur

C. albicans besitzt wie alle Pilze eine Zellwand. Diese hat hauptsächlich zwei Funktionen: Sie erhält die Zellform und ist dazu da, um mit der Umwelt in Kontakt zu treten.

Die Zellwand besteht aus maximal sechs mehr oder weniger elektronendichten Zelllagen und ist 250-260 nm dick (**Abb.1**) (100; S. 26). Ihren Hauptbestandteil bilden Mannanpolysaccharide, die auch als *Tsuchiya-Faktoren* bezeichnet werden und deren Anteil vor allem in den elektronendichten Schichten besonders hoch ist (37, 110, 152). Mannane von *Candida* bestehen aus α -1,6-verknüpften Mannose-Einheiten. An dieses Grundgerüst sind weitere Mannose-Monomere in α -1,2 und α -1,3 Position gebunden (146). An Hand der *Tsuchiya-Faktoren* können sogar verschiedene Serotypen von *C. albicans* unterschieden werden (148).

Die Zellwand enthält außerdem Glucane, die aus Glukosemolekülen aufgebaut sind, die entweder β -1,3 oder β -1,6 glykosidisch verbunden sind und besonders in den elektronentransparenten Schichten auftreten. Zudem enthält die Zellwand Chitin und verschiedene Lipide (151). Die äußerste Schicht der Zellwand bildet sich nur aus, wenn bestimmte Kohlenhydrate im Nährmedium vorhanden sind oder der Pilz auf festem Nährboden wächst. Diese Schicht scheint besonders für die Adhärenz von *C. albicans* an menschliche Epithelzellen verantwortlich zu sein (78, 85).

Das Plasmalemma ist eine typische eukaryotische Phospholipid-Doppelmembran, die hauptsächlich aus Sterolen und Proteinen besteht. Sie ist der Hauptangriffspunkt der meisten Antimykotika.

Die Zellorganellen sind die einer eukaryontischen Zelle: Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, ein deutlicher Zellkern mit einer Doppelmembran, 80S-Ribosomen und Lipidvakuolen (70, 111). Das Genom ist diploid, bestehend aus acht Chromosomenpaaren (83, 91, 92).

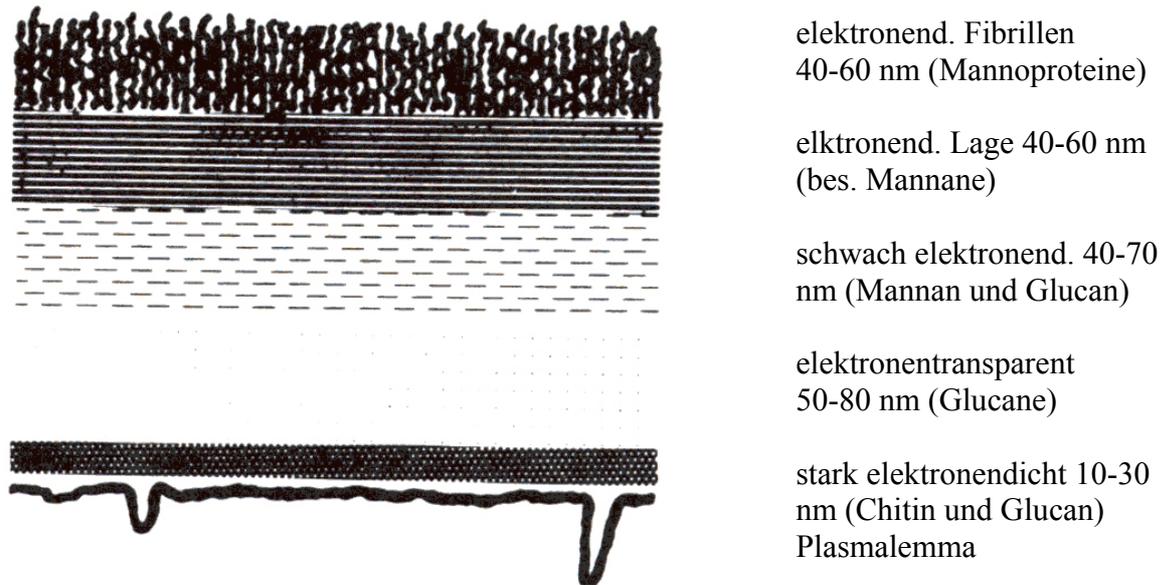


Abbildung 1. Aufbau der Zellwand von *Candida albicans* (100)

1.1.3 Morphogenese

C. albicans kommt in vier morphologisch verschiedenen Formen vor: als Blastospore, Pseudohyphe, Hyphe und Chlamydospore. Welche der verschiedenen Erscheinungsbilder auftritt, ist stark vom Nährmedium abhängig. In infizierten Geweben kommen meistens sowohl Hefen als auch Hyphen bzw. Pseudohyphen vor (100).

Die Blastospore, die auch als Hefezelle bezeichnet wird, ist eine 5-7µm breite und 6-10µm lange eiförmige Zelle. Sie vermehrt sich durch Sprossung. Es kommt zu einem Längenwachstum, anschließend zur Kernteilung und zur Ausbildung eines Septums. Schließlich trennen sich die beiden Blastosporen voneinander.

Hyphen sind verzweigte tubuläre Strukturen, die aus vielen durch Septen unterteilten Zellen bestehen. Sie entstehen aus Blastosporen oder aus bereits bestehenden Hyphen. Als Myzel wird ein Geflecht von Hyphen bezeichnet.

Pseudohyphen haben mikroskopisch gesehen eine große Ähnlichkeit mit echten Hyphen. Im Gegensatz zu diesen bestehen sie aber aus durch Sprossung entstandenen Einzelzellen, die sich nicht voneinander getrennt haben und die nicht septiert sind.

Die vierte Erscheinungsform, die Chlamydospore, wurde bisher nur *in vitro* beobachtet. Chlamydosporen sind dickwandige, kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 9 µm. Sie werden von Pseudohyphen und Hyphen gebildet und von diesen meist durch eine dazwischen liegende „Suspensor Zelle“ getrennt. Sie werden gewöhnlich als „ruhende“ Formen von *C. albicans*

angesehen und wachsen nur auf nährstoffarmen Nährböden mit einer geringen Glukosekonzentration. Die Zugabe von Detergenzien verstärkt das Wachstum von Chlamydosporen ebenso wie eine Temperatur zwischen 25-30°C. Durch Licht wird die Chlamydosporen-Bildung gehemmt. Da Chlamydosporen ausschließlich von *C. albicans* gebildet werden, stellt dies eine gute Unterscheidungsmöglichkeit zu anderen *Candida*-Spezies dar (20, 67, 73, 100).

1.1.4 Lokale Infektionen beim Menschen durch *C. albicans*

Von den etwa 50000 verschiedenen Arten von Pilzen sind bisher weniger als 300 als Krankheitserreger des Menschen bekannt. In der Medizin hat sich eine Einteilung der Pilze in Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze (sog. DHS-System nach Rieth) durchgesetzt (113). *C. albicans* gehört zu den Hefen. Von den etwa 150 Arten der Gattung *Candida* ist nur eine kleine Anzahl humanpathogen. Dabei spielt *C. albicans* mit 50-70% die größte Rolle, gefolgt von *Candida tropicalis* mit 10-20% und *Candida parapsilosis* sowie *Candida glabrata* mit jeweils 10% (91).

Candida-Spezies kommen beim Menschen saprophytär vor. *C. albicans* ist bei 30-50% aller gesunden Menschen nachweisbar, ohne dass Krankheitserscheinungen hervorgerufen werden. Man spricht daher auch von opportunistischen Krankheitserregern (111).

Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer manifesten Infektion sind (99, 100, 132):

- Immunschwäche durch HIV-Infektion, angeborene Immunkrankheiten, Radiotherapie oder Pharmaka wie Immunsuppressiva, Glukokortikoide, Zytostatika
- Säuglings- und Greisenalter, Schwangerschaft
- Antibiotika
- Stoffwechselerkrankungen und Endokrinopathien (Diabetes mellitus, Cushing Syndrom, Adipositas)
- lokale Belastung (ständige Feuchtigkeit, Okklusion)

Meist sind die Haut und die angrenzenden Schleimhäute von einer Infektion betroffen. Gerade in den letzten 20 Jahren ist aber auch die Inzidenz für systemische *Candida*-Infektionen stark angestiegen (34). Dies liegt weniger am Auftreten des Krankheitsbildes AIDS als vielmehr an der verbesserten Intensivmedizin und den vielen Transplantationspatienten. In den 80er Jahren ist die Häufigkeit der *Candida*-Sepsis um 487% gestiegen und macht 15% aller Blutinfektionen aus (82, 98).

1.1.4.1 Kutane Infektion

Bei der kutanen Kandidose sind vor allem die intertriginösen und interdigitalen Bereiche und beim Säugling der Windelbereich betroffen. Auf Grund des feuchtwarmen Klimas und der häufigen erosiv-mazerativen Hautveränderungen kommt es hier leicht zur Ansiedlung von *C. albicans*. Das klinische Bild zeigt teils nässende, teils schuppige Erytheme und Erosionen mit teilweise weißlichen Auflagerungen. Randständig treten meist Pusteln auf (99, 100, 115).

1.1.4.2 Orale Infektion

Die orale *Candida* Infektion, die auch als Mund-Soor bezeichnet wird, ist im typischen Fall gekennzeichnet durch pseudomembranöse, abstreifbare weiße Beläge. Die Mundschleimhaut ist meist gerötet.

Häufig sind Säuglinge und Kleinkinder betroffen oder ältere Patienten, deren Zahnprothese schlecht sitzt. Bei Erwachsenen tritt die orale Kandidose meist nur nach einer Immunsuppression z. B. durch die Verwendung von Glukokortikoid-Atemwegs-Sprays mit Ablagerung der Glukokortikoide an der Mundschleimhaut oder bei Vorliegen einer HIV-Infektion auf (16, 115).

1.1.4.3 Vaginale Infektion

Es wird geschätzt, dass 75% aller Frauen mindestens einmal in ihrem Leben eine vulvovaginale Kandidose durchmachen (139). Von diesen erleiden 40-45% die Erkrankung zwei oder mehrmals, während 5% der Frauen sogar von einer immer wiederkehrenden oder chronischen vulvovaginalen Kandidose, definiert als vier oder mehr Ereignisse im Jahr, betroffen sind (23, 134). In 80-85% der Fälle wird *C. albicans* als Erreger der vulvovaginalen Kandidose identifiziert. Subjektive Beschwerden sind Juckreiz und Brennen. Es kommt zu einem ausgeprägten Erythem und Ödemen im Bereich der Vulva, weißlichen, abwischbaren Auflagerungen an der Vagina und einem weißen, wässrigen bis „cottage-cheese“-artigen Ausfluss. Der vaginale pH-Wert ist in der Regel unverändert bei pH 3,6-4,5 (55, 100, 126, 147). Schwangerschaft ist einer der häufigsten prädisponierenden Faktoren. Die Inzidenz einer vulvovaginalen Kandidose ist in dieser Zeit, vor allem im dritten Trimenon, doppelt so hoch wie bei Nicht-Schwangeren (10). Durch den hohen Östrogengehalt und den damit verbundenen Anstieg an Glykogen in der Vaginalschleimhaut entsteht eine förderliche Umgebung für *Candida*-Spezies. Östrogene beschleunigen *in vitro* zudem das Wachstum von *C. albicans* (161). Auch die Einnahme von Breitspektrum-Antibiotika gilt als prädisponierender Faktor für eine Vulvovaginal-Kandidose. Diese Medikamente steigern die Kolonisation von *Candida* in der Vagina von 10 auf 30%. Vor allem die Antibiotika, die die

protektiven Laktobazillen in der Vagina hemmen, wie Penizilline, Cephalosporine und Tetracycline, prädisponieren eine Patientin für eine vermehrte Kolonisation mit *Candida* (10, 138). Die vulvovaginale Kandidose tritt besonders im geschlechtsreifen Alter auf.

Die Ursachen der chronischen vulvovaginalen Kandidose sind meist nicht geklärt, allerdings stellen Krankheiten wie AIDS und Diabetes mellitus, Chemo- oder immunsuppressive Therapie sowie der Gebrauch von Antibiotika und Glukokortikoiden prädisponierende Faktoren dar.

1.1.5 Pharmakotherapie

Zur Bekämpfung der humanpathogenen Pilzarten stehen einige sowohl intern als auch extern applizierbare Pharmaka zur Verfügung. Die meisten von ihnen greifen in die für den Pilz essentielle Ergosterolbiosynthese ein (**Abb. 2**). Im Folgenden sollen nur Antimykotika behandelt werden, die gegen *Candida*-Infektionen eingesetzt werden. Diese lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen (46, 77, 80, 95, 109, 114, 119, 157):

- **Azole**

Die Entwicklung der Azol-Antimykotika wird seit etwa 1967 intensiv verfolgt. Die Azole greifen in die für humanpathogene Pilze essentielle Ergosterol-Biosynthese ein. Dabei hemmen sie die 14- α -Demethylase, ein Enzym, das zur Gruppe der pilzspezifischen Cytochrom P-450-Isoenzyme gehört. Dadurch kommt es zu einem Mangel an Ergosterol und einer Akkumulation von Lanosterol in der Zellmembran. Ergosterol ist das wichtigste Füllmaterial in der Zellmembran der Pilze. Durch die Verringerung von Ergosterol verändert sich die Fließfähigkeit, wodurch die Wirksamkeit der membrangebundenen Enzyme wie der Chitinsynthetase beeinträchtigt sowie eine erhöhte Permeabilität erreicht wird.

Die Wirkung der Azol-Antimykotika ist meist fungistatisch.

Das Grundgerüst dieser Substanzklasse bildet ein Diazol- bzw. ein oder mehrere Triazolringe. Die neueren Substanzen wie Fluconazol oder Itraconazol enthalten alle einen Triazolring, wodurch die Affinität an das fungale Cytochrom P-450 erhöht wird. Die Folge ist eine bessere Verträglichkeit, eine längere Halbwertszeit und weniger Wechselwirkungen.

Zur externen Anwendung stehen Clotrimazol, Bifonazol, Ketoconazol, Miconazol, Econazol, Fenticonazol, Oxiconazol, Tioconazol, Sertaconazol, Croconazol und Isoconazol zur Verfügung.

Zur internen Behandlung stehen Fluconazol, Itraconazol, Miconazol als Mundgel, Ketoconazol und seit 2002 zusätzlich Voriconazol zur Verfügung. Ketoconazol, das erste orale Breitspektrum-Azol für tiefe Mykosen, hat den Nachteil, dass es beträchtliche Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka eingeht und seltene aber erhebliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen

besitzt. Darunter fällt die gewöhnlich reversible Hepatotoxizität, die jedoch bereits auch zu einigen Todesfällen geführt hat und die Endokrinopathie, die sich bei Männern als Gynäkomastie und bei Frauen als unregelmäßige Menses äußert. Bei der vaginalen Candidose wird im Falle einer systemischen Therapie meist Fluconazol als Einmaldosis mit 150 mg oder Itraconazol als Eintagestherapie mit zwei mal zwei Kapseln à 100 mg oral verabreicht.

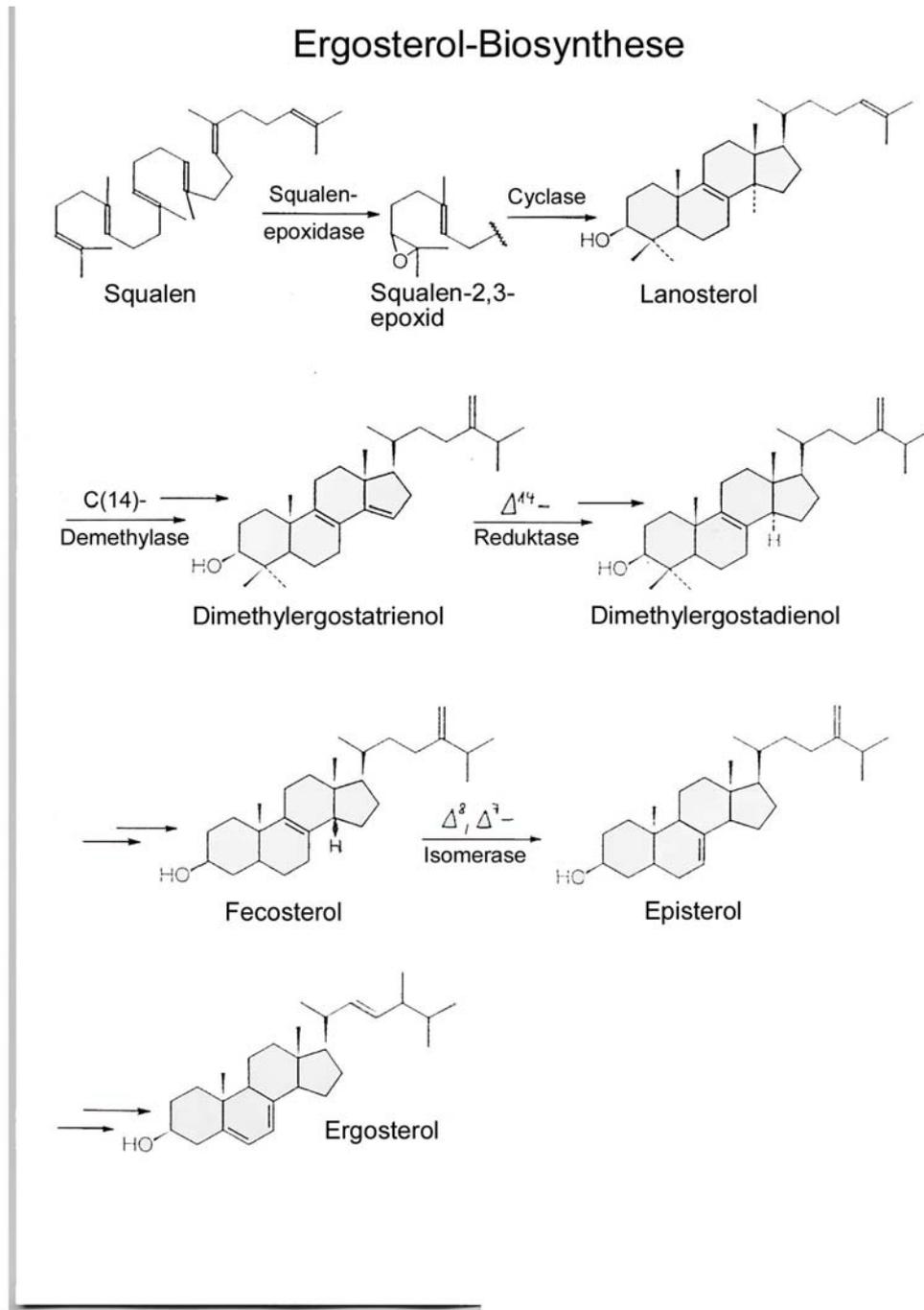


Abbildung 2. Ergosterol-Biosynthese von Pilzen

- **Polyen-Antimykotika**

Zu den Polyen-Antimykotika gehört das parenteral verabreichbare Amphotericin B sowie die ausschließlich lokal anwendbaren Substanzen Nystatin und Natamycin. Polyen-Antimykotika werden seit 1955 aus Kulturfiltraten von Streptomyces-Arten isoliert. Polyene besitzen einen makrozyklischen Laktoring mit einer stark hydrophoben Seite, bestehend aus mehreren konjugierten Doppelbindungen, und einer hydrophilen Seite mit dem glykosidisch gebundenen Aminozucker Mykosamin.

Die antimykotische Wirkung beruht auf der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Polyenmolekülen und dem Ergosterol in der Pilzzellmembran. Dadurch kommt es zur Entstehung von Poren in der Zellmembran und als Folge zu einer Störung der Ergosterol-Funktion mit einem erhöhten Ausfluss von Elektrolyten wie Kalium. Zudem führt dies zu einer irreversiblen ATPase-Hemmung der Membran. Die Wirkung von Amphotericin B ist sowohl fungistatisch als auch fungizid. Amphotericin B wird bei allen tiefen Organmykosen unabhängig vom jeweiligen Erregertyp angewendet. Bei den Nebenwirkungen steht vor allem die Nephrotoxizität im Vordergrund. Durch die liposomale Verkapselung von Amphotericin B soll das Nebenwirkungsprofil etwas günstiger geworden sein.

Bei der vaginalen Kandidose wird ausschließlich das Polyen-Antimykotikum Nystatin lokal angewendet.

- **Allylamine**

Die beiden Vertreter der Allylamine sind Naftifin, das nur lokal angewendet wird, und Terbinafin, das sowohl in Creme- als auch in Tablettenform im Handel ist. Beide Substanzen wirken primär gegen Dermatophyten, werden aber auch bei Dermatomykosen durch Candida-Spezies angewendet. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung des Enzyms Squalenepoxidase bei der Ergosterol-Biosynthese. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Umwandlung von Squalen in Lanosterol.

Bei der vaginalen Kandidose kommt diese Substanzklasse nicht zur Anwendung.

- **Morpholin-Derivate**

Der einzige auf dem Markt befindliche Vertreter aus der Gruppe der Morpholine ist das Amorolfin. Es wirkt sowohl fungistatisch als auch fungizid und wird nur lokal angewendet. Diese Substanz hemmt ebenfalls die Ergosterol-Biosynthese durch Hemmung der $\Delta 14$ -Reduktase und der $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase. Durch die zwei unterschiedlichen Angriffspunkte ergibt sich ein synergistischer Effekt, der das Risiko des Auftretens von resistenten Mutanten reduziert. Amorolfin wird hauptsächlich zur Behandlung von Onychomykosen als Nagellack und als Creme zur Behandlung von Dermatomykosen eingesetzt.

- **Ciclopiroxolamin**

Ciclopiroxolamin verhindert die Aufnahme essentieller Substanzen in die Pilzzelle und wirkt fungistatisch. Es wird nur topisch angewandt, zumeist zur Behandlung von Onychomykosen. Zur Behandlung der vaginalen Candidose steht eine Creme zur Verfügung.

- **Flucytosin**

Flucytosin wird fast ausschließlich in Kombination mit Amphotericin B eingesetzt. Es wirkt als Antimetabolit fungistatisch bis fungizid. Sensible Pilzzellen schleusen Flucytosin durch die Cytosinpermease in die Pilzzellen ein. Dort wird es durch die Cytosindeaminase in 5-Fluoruracil umgewandelt. Dadurch kommt es zur Störung der Proteinsynthese und der DNA-Synthese. Es wird bei schweren systemischen Pilzinfektionen wie zum Beispiel *Candida*-Endocarditis eingesetzt. Sehr seltene gravierende, unerwünschte Wirkungen sind die ulceröse Enteritis/Colitis und die Knochenmarksdepression mit tödlicher Agranulozytose.

Aufgrund der steigenden Resistenzen vor allem bei HIV-infizierten Patienten gegen Antimykotika wie Fluconazol ist es wichtig, nach neuen Angriffspunkten zur Behandlung von Pilzinfektionen zu suchen (2, 3, 127, 128). Eine neu entwickelte Substanzklasse sind die Echinocandine. Sie stören den Aufbau der Zellwand der Pilze, indem sie die β -1,3-D-Glucansynthase hemmen. Ein erster Vertreter dieser Substanzklasse, Caspofungin, wurde 2002 in Deutschland für invasive Aspergillosen bei Erwachsenen zugelassen, die auf Amphotericin B und Itraconazol nicht ansprechen. Wegen seiner hohen *in vitro*-Aktivität gegen *Candida*-Spezies wurde es 2003 auch für invasive Candidosen zugelassen (7, 32, 34). Mycine stellen eine weitere neue Substanzklasse dar, die an der Zellwand angreifen. Bisher ist jedoch noch kein Vertreter zugelassen. Ein besonders interessanter Angriffspunkt sind die Sap von *C. albicans*, mit denen sich meine Doktorarbeit beschäftigt.

1.1.6 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

C. albicans gilt bei intaktem Immunsystem und gesunder mikrobieller Flora des Wirtes als normaler und harmloser Kommensale der Schleimhäute und des Verdauungstraktes warmblütiger Tiere und des Menschen (154). Durch Immunschwäche oder Störung der mikrobiellen Flora des Wirtes kann *C. albicans* durch ungehemmtes Wachstum vom Kommensalen zum Parasiten werden. Die Infektion beginnt in der Regel als lokale Schleimhautinfektion, in schweren Fällen kann es jedoch zu einer systemischen Mykose mit oft tödlichem Ausgang kommen. Man geht davon aus, dass für die Infektion kein einzelner dominanter Virulenzfaktor verantwortlich ist, sondern dass mehrere

Virulenzfaktoren zusammenwirken müssen (101). Zu den Virulenzfaktoren von *C. albicans* gehören:

- **Dimorphismus**

Unter Dimorphismus wird der reversible Wechsel von der Hefe- in die Hyphenform verstanden. Der Hyphenform wird bei Kandidosen hinsichtlich der Adhäsion und der Invasion eine besondere Virulenz zugesprochen (28, 72, 91). Außerdem wurde beobachtet, dass *C. albicans* Hyphen bildet, um *in vitro* aus phagozytierenden Makrophagen und Neutrophilen zu entkommen (5, 143). Letztendlich muss man aber festhalten, dass sowohl die Hyphe als auch die Hefe für die Pathogenese der Kandidose eine wichtige Rolle spielt. Wahrscheinlich kann sich die eine morphologische Form besser als die andere an die spezifischen Mikronischen des Wirtes anpassen (100).

- **Adhäsionsfaktoren**

Die Adhärenz des Pilzes an die Wirtsoberfläche ist der erste Schritt einer Infektion. Sie wird erreicht durch eine Kombination von spezifischen (Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen) und unspezifischen (Mucopolysaccharid-, Protein-Protein, Lektin-Kohlenwasserstoff-Interaktionen) Mechanismen, die der Hefe erlauben, sich an viele unterschiedliche Gewebetypen und künstliche Oberflächen anzuheften (26, 102). Hierbei sind verschiedene Adhäsine wie Fimbrien, Pili und Membranproteine beteiligt. Aufgrund seiner Adhäsionsfaktoren bindet *C. albicans* besser an menschliche Oberflächen als andere *Candida*-Spezies (100).

- **Phänotypisches switching**

Die meisten *C. albicans* Stämme sind in der Lage, fast alle zellulären Charakteristika der Hefezelle reversibel zu verändern. Dieses Switching findet spontan und mit einer Häufigkeit von 10^{-4} bis 10^{-1} statt. Zu den zellulären Charakteristika, die verändert werden können, zählen: die unterschiedliche Expression von Genen, die Änderung von Zelloberflächeneigenschaften wie Adhärenz und antigene Strukturen und der zelluläre Phänotyp als „white-“ oder „opaque-“ Form (90, 136, 137).

Bei HIV-Patienten ohne orale Kandidose konnte man feststellen, dass die switching-Frequenz der aus der Mundhöhle gewonnenen Isolate von *C. albicans* deutlich erhöht war gegenüber Isolaten von gesunden Individuen (153).

- **Thigmotropismus**

Thigmotropismus, im Englischen auch als „contact sensing“ bezeichnet, beschreibt die Fähigkeit des Pilzes, sein Hyphenwachstum zielgerichtet den Oberflächenstrukturen des Wirtes anzupassen. Dabei wachsen die Hyphen in die Richtung von Rissen, Furchen und Poren in der Horn- bzw. Epithelschicht, wodurch die Penetration des Wirtsepithels erleichtert wird, indem die Hyphe Schwachstellen im Gewebe erkennt (52, 133). Gow et al. haben herausgefunden,

dass der Thigmotropismus durch Calciumkanal-Blocker und andere spannungsabhängige Ionenkanal-Blocker wie Verapamil vermindert wird. Die Hemmstoffe reduzierten den Anteil der Hyphen, die aufgrund eines Kontaktes mit einem Oberflächendefekt ihre Wachstumsrichtung ändern, was eine Beteiligung dieser Kanäle bei der thigmotropischen Reaktion nahe legt (156).

- **Hydrolytische Enzyme**

Hydrolytische Enzyme von *C. albicans* sind Phospholipasen, Lipasen und Proteinasen. Phospholipasen sind an der Invasion und der Epithelzellschädigung während einer Infektion beteiligt (47, 97). Die Rolle der Lipasen als Virulenzfaktoren ist bisher wenig untersucht worden. Auf die Funktion der verschiedenen Proteinasen werde ich auf den folgenden Seiten näher eingehen.

1.1.7 Die sekretorischen Aspartatproteinasen von *C. albicans*

1.1.7.1 Struktur, biochemische Eigenschaften und Synthese

Proteinasen dienen in der Regel dazu, Peptide zu Ernährungszwecken zu spalten. Alle Proteinasen von *C. albicans* gehören zur selben Klasse der sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap). Ihr Name beschreibt die zwei wichtigsten Charaktere dieser Enzyme: Es sind Aspartatproteinasen und sie wirken extrazellulär. Das bekannteste Mitglied dieser Enzymklasse ist das Verdauungsenzym Pepsin. *C. albicans* besitzt zehn verschiedene Isoenzyme. Bisher ist nur die Struktur von Sap2 bekannt, da es das am meisten sezernierte Protein *in vitro* ist, wenn Proteine die einzige Stickstoffquelle im Nährmedium darstellen (63).

Sap bestehen aus einer einzelnen Peptidkette mit etwa 340 Aminosäuren. Ihr pH-Optimum ist meist im sauren Bereich. Sap2 denaturiert bei pH-Werten oberhalb von etwa 8,4 irreversibel, jedoch besitzt sie bei neutralem pH-Wert noch die Hälfte ihrer Aktivität (122, 155). Die zehn Sap-Isoenzyme weisen Sequenzhomologien im aktiven Zentrum auf, haben eine ähnliche tertiäre Struktur und sie werden alle von Pepstatin A, einem typischen Proteinaseinhibitor, gehemmt (29). Die elektrostatische Ladung reicht von -21 für Sap2 bis +2 für Sap6. Dies scheint der Grund zu sein für die unterschiedlichen pH-Optima der unterschiedlichen Proteinasen und der damit verbundenen Möglichkeit von *C. albicans*, verschiedene Gewebe zu infizieren (145).

Aspartatproteinasen kommen bei Vertebraten, Pilzen, Protozoen, Pflanzen und Retroviren vor und zeichnen sich alle durch denselben katalytischen Mechanismus aus (29). Sie sind durch die symmetrische Anordnung zweier in etwa gleich großer Domänen charakterisiert, was durch Röntgenstrukturanalysen nachgewiesen werden konnte. Die vier konservierten Cysteinreste sind wichtig

für die dreidimensionale Struktur des Enzyms. Den Kern des aktiven Zentrums bilden zwei Aspartatreste, die wichtig sind für die Spaltung der Peptidbindung (1). Die Spaltung erfolgt durch den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls. Das deprotonierte Aspartat polarisiert das Wassermolekül, das andere bildet eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung aus. Dadurch wird die C=O-Bindung des Peptids polarisiert und der nukleophile Angriff am Kohlenstoff erleichtert. Im tetraedischen Übergangszustand ist das Wassermolekül intermediär an die Amidgruppe gebunden (11) (**Abb. 3**). Die bevorzugten Substrate der einzelnen Sap sind größere hydrophobe Aminosäuren, wobei die Spezifität von einer Proteinase zur anderen differiert (75).

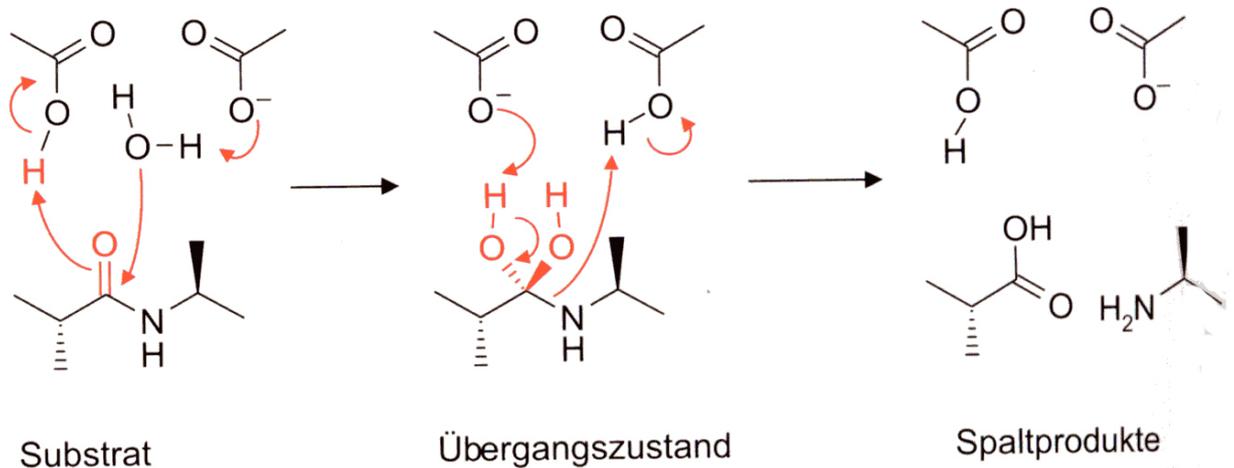


Abbildung 3. Katalytischer Mechanismus der Spaltung einer Peptidbindung durch die beiden Aspartate im aktiven Zentrum (11).

Die Sap werden zuerst als inaktive Zymogene mit etwa 60 Aminosäuren mehr als das reife Enzym synthetisiert. Die etwa 18 Aminosäuren lange Signalsequenz am N-Terminus wird von der Signalpeptidase im endoplasmatischen Retikulum abgespalten. Anschließend wird das Propeptid im Golgiapparat an einer Lys-Arg oder Lys-Lys Schnittstelle durch Kex2, andere Proteinase oder durch Autokatalyse gespalten und damit aktiviert. Das reife Enzym wird in Vesikel eingebaut und durch Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran in den Extrazellulärraum sezerniert (66, 68) (**Abb. 4**).

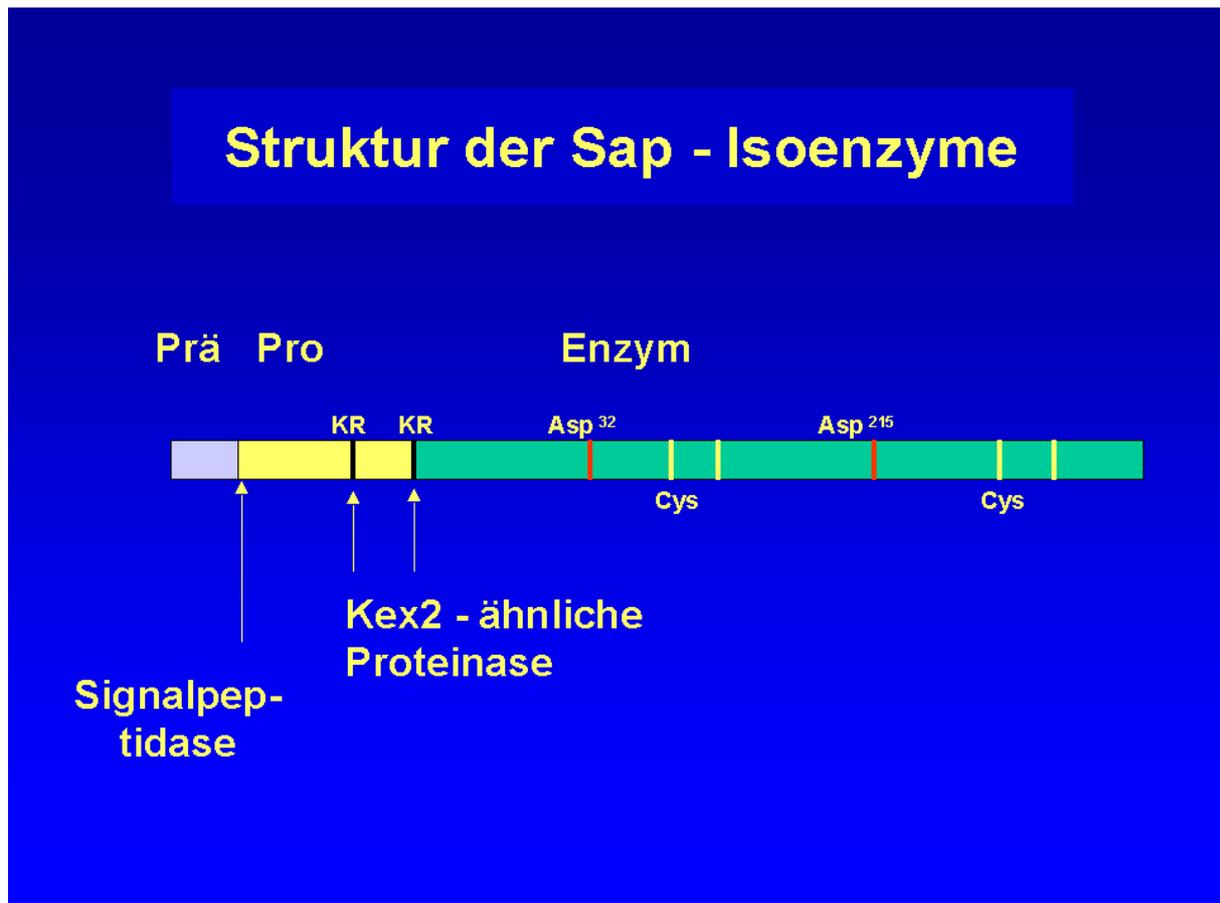


Abbildung 4. Struktur von Sap1 mit Elementen, die in allen Sap gefunden werden. Das *SAP1* Gen wird in ein Präpropeptid translatiert. Die ersten 18 Aminosäuren werden durch die Signalpeptidase im Endoplasmatischen Retikulum abgespalten.

1.1.7.2 Bedeutung als Virulenzfaktoren

Bereits 1965 wurden von Staib et al. eine sekretorische Proteinase bei *C. albicans* entdeckt (141). Vier Jahre später postulierte Staib diese das erste Mal als möglichen Virulenzfaktor, indem er zeigte, dass ein proteolytisch aktiver Stamm von *C. albicans* virulenter war als ein Proteinase-negativer Stamm (142). Dieses Ergebnis konnte in den folgenden Jahren in vergleichbaren Tierversuchen mit Proteinase-negativen Mutanten von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden (81, 118). Ebenfalls gelang es recht bald *in vivo*, Sap-Antigene in infizierten Geweben nachzuweisen (123). Die Tatsache, dass wenig oder nicht pathogene *Candida*-Spezies keine oder nur sehr geringe Mengen an Sap produzieren, unterstützt die Behauptung, dass die Pathogenität von *C. albicans* direkt mit der Menge an Sap Sekretion korreliert (120). In den letzten Jahren konnte anhand von Genexpressionsstudien an Modellen der oralen und kutanen Kandidose nachgewiesen werden, dass die Expression

sekretorischer Aspartatproteinase Gene (*SAP*) direkt mit der Invasion von *C. albicans* korreliert (129, 130). Zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion wurden verschiedene *SAPs* nachgewiesen. Dies führt zu der Annahme, dass verschiedene *Sap* bei unterschiedlichen Infektionsstadien von Bedeutung sind (129, 130). Außerdem konnte *in vivo* gezeigt werden, dass HIV-positive Patienten mit oropharyngealer Kandidose eine doppelt so hohe Proteinase-Aktivität zeigen wie HIV-negative Kontrollgruppen mit derselben *C. albicans*-Infektion (103). Interessanterweise gab es auch einen Zusammenhang zwischen der Proteinase-Aktivität und der Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika: Die *C. albicans* Population mit der höchsten Proteinase-Aktivität war am wenigsten empfindlich gegenüber Ketoconazol und Fluconazol (103). Später konnte diese höhere Proteinase-Aktivität auch bei HIV-positiven Patientinnen mit einer vaginalen Kandidose gezeigt werden (31). Einen weiteren Beweis, dass die Aspartatproteinasen Virulenzfaktoren von *C. albicans* darstellen, lieferte der Einsatz von Proteinaseinhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass Pepstatin A die Penetration von *C. albicans* durch die Oberfläche der Mukosa in Mäusen verhindert, aber nicht die Verteilung der Keime, wenn diese die Blutgefäße erreicht haben (38). Die Invasion und Schädigung verschiedener Gewebe konnte ebenfalls in einigen Modellen durch Pepstatin A gehemmt werden (129, 130).

1.1.7.3 Die *SAP*-Genfamilie

SAP-Genfamilien wurden außer bei *C. albicans* auch bei *C. parapsilosis* (89), *C. dubliniensis* (49) und *C. tropicalis* (89, 160) nachgewiesen. Die *SAP*-Genfamilie von *C. albicans* umfasst 10 Mitglieder. Innerhalb dieser Gruppe existieren zwei relativ eng verwandte Gruppen. *SAP1-3* sind bis zu 67% identisch und *SAP4-6* bis zu 89%, während *SAP7* nur zu 20-27% identisch zu den anderen *SAP*-Genen ist (**Abb. 5**) (66, 89). Das erste *Candida SAP*-Gen (*SAP1*) wurde von Hube et al. mit Hilfe der PCR und der Kenntnis der N-terminalen Aminosäuresequenzen von gereinigten Proteinasen und der bekannten konservierten Sequenzen kloniert (65). Alle zehn *SAP*-Gene kodieren Präproenzyme, die etwa 60 Aminosäuren länger sind als das reife Enzym. Die Gene besitzen einen offenen Leserahmen von 1173-1764 Basenpaaren und sind auf fünf verschiedenen Chromosomen lokalisiert (40, 66).

Die ersten Untersuchungen der *SAP* Expression dienten dazu, herauszufinden, welche *SAP*-Gene bei den unterschiedlichen *in vitro*-Bedingungen exprimiert werden. Die Untersuchungen der *SAP*-Genexpression *in vitro* zeigte, dass bei 30-37°C in Medien, in denen Proteine die einzige Stickstoff Quelle darstellen, hauptsächlich *SAP2* exprimiert wird (63). Bei 25°C steigt die Menge an *SAP8* Transkript an (88). *SAP1* wird nur in der „opaque-“ Form und nicht in der „white-“ Form, *SAP4-6* während der Hefe-Hyphen-Transformation bei neutralem pH exprimiert (63) (**Abb. 6**). *SAP7* wurde *in vitro* bisher nicht nachgewiesen, so dass man nichts über seine biologische Funktion aussagen

kann. *SAP9* und *SAP10* scheinen konstitutiv sowohl von der Hyphen- als auch von der Hefeform exprimiert zu werden (Felk unpubliziert). *C. albicans* ist also in der Lage, in Abhängigkeit von der physiologischen Situation unterschiedliche Proteinase-Gene bzw. Proteinasen zu exprimieren. Eine Möglichkeit herauszufinden, welche Funktion die einzelnen Proteinasen bei den unterschiedlichen Infektionen haben, besteht darin, verschiedene *SAP*-Nullmutanten in unterschiedlichen Kandidose-Modellen zu testen.

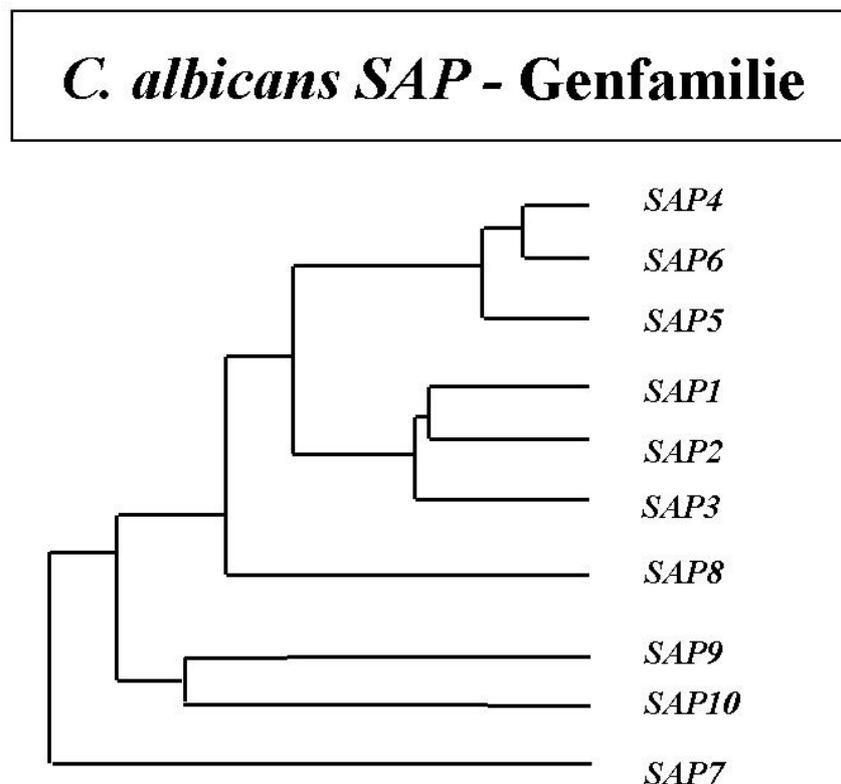


Abbildung 5. Dendrogramm der *SAP*-Gene von *C. albicans* (144)

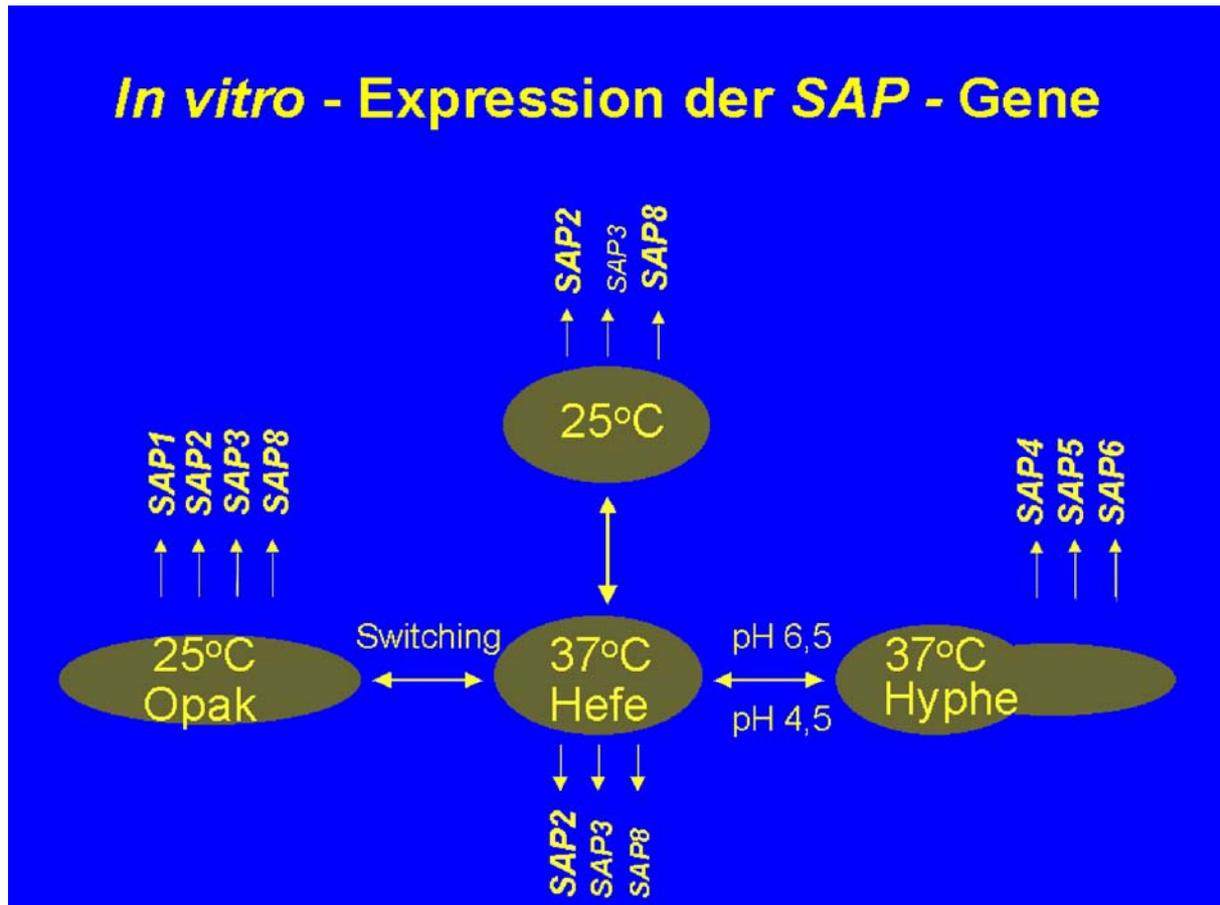


Abbildung 6. Differentielle Regulation der *SAP*-Gene bei unterschiedlichen *in vitro* Bedingungen (63)

1.1.7.4 Funktionen der Sap-Isoenzyme

Obwohl die sekretorischen Aspartatproteinasen von *C. albicans* bekannte Virulenzfaktoren sind, ist bisher wenig über die Funktionen der einzelnen Isoenzyme bekannt. Die Substratspezifität der Proteinasen ist breit. Sap2 ist beispielsweise in der Lage, Oberflächenproteine und Matrixproteine des Wirtes wie Muzin, Fibronectin und Laminin zu degradieren (24, 92). Dies scheint wichtig zu sein für die Adhärenz von *C. albicans* an Epithelzellen. Eine weitere wichtige Aufgabe der Sap ist die Spaltung von menschlichen Proteinen wie Albumin, Keratin, Kollagen, Hämoglobin und IgA, einer der Hauptabwehrmechanismen gegen mikrobielle Angriffe (124). Die Spaltung von IgA scheint die Adhärenz des Pilzes an die Wirtsoberfläche zu verstärken, was für einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *Candida* gehalten wird (86). Sap4-6 scheint wichtig zu sein für *Candida*, um sich gegen die Phagozytose durch Makrophagen zu wehren. Dies wurde durch eine $\Delta sap4-6$ Mutante indirekt bestätigt, die zu 53% mehr durch Makrophagen eliminiert wurde (12). In *ex vivo*-Experimenten basierend auf Modellen der oralen und kutanen Candidose

mit den Einfachmutanten *Δsap1*, *Δsap2* und *Δsap3* konnte gezeigt werden, dass verglichen mit dem Wildtyp-Stamm alle drei Mutanten die Virulenz des Pilzes verringerten. Der Virulenz-Phänotyp der *Δsap4-6*- Dreifachmutante war ähnlich dem des Wildtyps. Daraus lässt sich schließen, dass Sap1-3 mehr als Sap4-6 bei der oralen und der kutanen Kandidose von Bedeutung sind (129, 130).

1.2 Die menschliche Vaginalschleimhaut

1.2.1 Anatomie und Ultrastruktur

Die Vagina erstreckt sich vom Scheideneingang (Ostium vaginae) bis zum äußeren Muttermund (Portio vaginalis uteri) und ist 8-10 cm lang. Ausgekleidet wird sie von einem mehrschichtigen, unverhornten, glykogenreichen Plattenepithel, dessen Differenzierung zyklusphasenabhängig ist. Unverhornte mehrschichtige Plattenepithelien kommen in feuchter Umgebung vor und bestehen von innen nach außen aus drei Schichten: das Stratum basale, dessen Zellen die Aufgabe haben, durch Zellteilung die oberen Schichten zu generieren, das Stratum spinosum, das für mechanische Stabilität sorgt, und das Stratum superficiale, das im Gegensatz zur obersten Schicht des verhornten Plattenepithels noch lebende Zellen enthält, die sich von den unteren Zellschichten lediglich dadurch unterscheiden, dass sie sich abgeflacht haben (**Abb. 7**) (51, 71, 113). Stratum basale und Stratum spinosum werden zusammenfassend als Stratum germinativum bezeichnet.

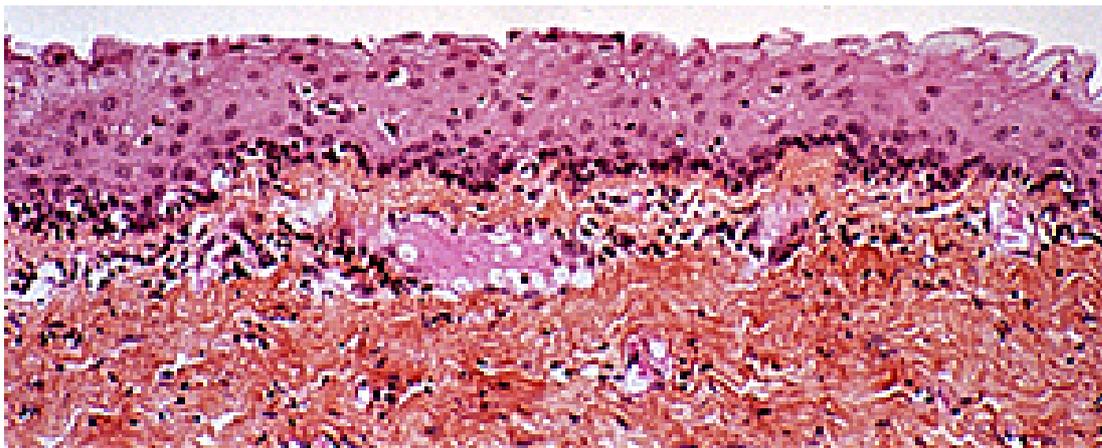


Abbildung 7. *In vivo*-Vaginalschleimhaut aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel (135)

1.2.2 Funktion, Physiologie und Immunologie

Die Vagina dient dem Schutz der inneren Genitale, als Kohabitationsorgan und als Geburtskanal.

Der Vaginalsehlim ist ein Gemisch aus Zervixsekret, abgestorbenen Plattenepithelzellen und Döderleinflora. Eine eigentliche Sekretion findet in der Vagina nicht statt. Es handelt sich vielmehr um eine durchblutungs- und hormonabhängige Transsudation, die prämenstruell ihr Maximum erreicht (51, 71).

Die Einlagerung von Glykogen in den Epithelzellen ist östrogenabhängig. In der Proliferationsphase kommt es proportional zum Östrogeneinfluss zu einem Epithelaufbau. Das Epithel ist zum Zeitpunkt der Ovulation am glykogenhaltigsten. In der Sekretionsphase kommt es zu einer vermehrten Abschilferung der Zellen, die nach Aufbrechen der Zellwand Glykogen freisetzen. Dieses wird hauptsächlich von Milchsäurebakterien (Döderleinflora) zu Milchsäure verstoffwechselt und hält somit ein saures Scheidenmilieu mit einem pH-Wert von 3,6-4,5 aufrecht (13). *Lactobacillus* ist der dominante Mikroorganismus in der Vagina von gesunden Frauen (4). Der vermutete Mechanismus, mit dem Lactobazillen die Vagina schützen, scheint der Konkurrenzkampf mit den entsprechenden pathogenen Keimen um das Nahrungsangebot und um die Adhärenzrezeptoren zu sein, und die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Milchsäure (104). Einige Lactobazillenstämme sind beispielsweise in der Lage, die Adhärenz und das Wachstum von *C. albicans in vitro* zu hemmen (105).

Die Rolle des Wirtsimmunsystems bei der Bekämpfung einer vaginalen Kandidose wird bisher nur wenig verstanden, allerdings deutet einiges darauf hin, dass die vaginale Immunantwort auf eine *Candida*-Infektion anders abläuft als die orale Immunantwort, wo CD4⁺-Zellen eine wichtige Rolle spielen (8, 17). In einem Mausmodell der vaginalen Kandidose konnte gezeigt werden, dass Mäuse eine begrenzte Form der Immunität nach einer früheren vaginalen Infektion erwerben, aber nicht nach einer systemischen Immunisierung (42, 43). Die Mäuse bekommen immer noch eine akute Infektion, auch wenn die Stärke und die Dauer der Infektion reduziert ist. Es wird vermutet, dass bei der vaginalen Kandidose andere Immunfaktoren neben der systemischen T-Zell vermittelten Immunität wichtig sind und dass zwar systemisch ein *Candida* Antigen-Gedächtnis vorkommt, dieses aber nicht auf die lokale Vaginalsehlimhaut übertragen wird, da systemische T-Zellen anscheinend nicht in die Vaginalsehlimhaut einwandern (8, 41). Interessanterweise besitzen die T-Zellen, die in der Vagina gefunden werden, auch einen anderen Phänotyp als die T-Zellen in der Peripherie (41).

Die Einwanderung von Leukozyten in die Genitalorgane ist sowohl beim Menschen als auch beim Tier zyklusabhängig und findet nach der Ovulation statt (140). Dabei spielt beim Menschen vor allem Interleukin-8 (IL-8) eine wichtige Rolle. Dieses Chemokin ist verantwortlich für die Aktivierung und

Anlockung von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (PMN, Neutrophile) (94). Die IL-8-Produktion wird ihrerseits durch die beiden Chemokine IL-1 α and TNF- α induziert. Chemokine werden von durchaus verschiedenen Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, PMN, Mastzellen, T-Zellen, Fibroblasten und auch Keratinozyten produziert (6).

PMN sind wichtige Zellen der angeborenen Immunantwort gegen systemische *C. albicans*-Infektionen und besitzen eine deutliche Aktivität gegen *Candida in vitro* (35, 100). Obwohl PMN in der Vagina der Maus, neben Makrophagen, Lymphozyten und verschiedenen anderen Leukozyten, mit 85% die vorherrschenden Zellen der Immunantwort sind, ist ihre Bedeutung für die Bekämpfung der vaginalen Kandidose bis jetzt unklar. Die Anwesenheit von PMN scheint im Mausmodell die Pilzzellzahl während einer Infektion nicht deutlich zu verringern (41, 125). Während es im Mausmodell einer vaginalen Kandidose zu einem Einstrom von PMN kommt (9), ist beim Rattenmodell nur eine minimale Infiltration von entzündlichen Zellen zu beobachten (21). Es ist daher fraglich, ob diese Tiermodelle für die Erforschung der Funktion der PMN bei der vaginalen Kandidose der Frau geeignet sind, zumal auch einige Chemokine wie IL-8 bei der Maus nicht identisch vorhanden sind (140), oder ob nicht ein rekonstituiertes humanes Vaginalschleimhautmodell bessere Ergebnisse liefert.

1.2.3 Pathologie der Vaginitis

Bei der Entzündung der Vagina unterscheidet man infektiöse und nicht infektiöse Kolpitiden. Nicht infektiöse Kolpitiden entstehen durch Chemikalien, allergische Reaktionen, Traumata oder eine Atrophie. Bei den infektiösen Kolpitiden sind die häufigsten Ursachen eine bakterielle Vaginose (BV; in 40-50% der Fälle), die Vulvovaginalkandidose (in 20-25% der Fälle) und Trichomoniasis (in 15-20% der Fälle).

Die BV ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines erhöhten pH-Wertes von pH 5-5,5. Die Vaginalflora verändert sich von einer *Lactobacillus* dominierten Flora zu einem Milieu, in dem *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* und andere anaerobe Bakterien vorherrschen. Der Fluor ist grau, dünnflüssig und nach Fisch riechend. Im Gegensatz zur Vulvovaginalkandidose (s.1.1.4.3) tritt keine Rötung und kein Juckreiz auf. Bei der Trichomoniasis ist der pH-Wert im Gegensatz zur Vulvovaginal-Kandidose durch die Verdrängung der Lactobazillen ebenfalls erhöht. Erreger ist *Trichomoniasis vaginalis*. Die Übertragung erfolgt fast ausschließlich sexuell. Klinisch erkennbar ist die Erkrankung an einem übel riechenden, gelb-grünlichen, schaumigen Fluor mit Brennen, Juckreiz und Dyspareunie. Die Vagina ist gerötet (51, 57, 113, 115).

1.3 Proteinaseinhibitoren

Aufgrund der steigenden Anzahl an resistenten *C. albicans*-Stämmen (19) ist es wichtig, nach neuen Möglichkeiten zu suchen, um Patienten mit *Candida*-Infektionen zu behandeln. Ein möglicher Angriffspunkt sind die sekretorischen Aspartatproteinasen von *C. albicans*. Ein bekannter Proteinaseinhibitor ist Pepstatin A, der häufig als Modellsubstanz eingesetzt wird, um die Virulenz bzw. die Funktion der Aspartatproteinasen zu untersuchen. Dieser Inhibitor hemmt relativ unspezifisch Aspartatproteinasen des HI-Virus, von *Candida*-Spezies, aber auch vom Menschen. Er kann aufgrund seiner schnellen Clearance aus dem Blut und seiner Toxizität nicht *in vivo* eingesetzt werden (121). Proteinaseinhibitoren hemmen die Spaltung des Substrates im aktiven Zentrum der Proteinase, indem sie den Übergangszustand der Substratspaltung simulieren und dadurch das aktive Zentrum blockieren (11). Durch die Kenntnis der Röntgenkristallstruktur von Sap2 wurde es möglich, gezielt Proteinaseinhibitoren gegen Sap von *C. albicans* zu entwickeln (1, 27). Ein Inhibitor, A-70450, hemmt Sap2 in einer subnanomolaren Menge, was eine deutliche Verbesserung zu Pepstatin A ist, wo die nötige Hemmkonzentration mehr als 15fach höher liegt (18). Ein wesentlicher Fortschritt bei der Suche nach neuen Proteinaseinhibitoren wurde durch die Einführung von Proteinaseinhibitoren in die HIV-Therapie gemacht. Die Proteinasen des HI-Virus sind ebenfalls vom Typ der Aspartatproteinasen. Bis jetzt sind fünf Proteinaseinhibitoren, nämlich Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir und Amprenavir, für die Therapie von AIDS zugelassen. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass Saquinavir und Indinavir auch die Sap-Aktivität dosisabhängig reduzieren können. Die Hemmwirkung lag bei beiden Stoffen bei 80-85%, und dies bei einer Konzentration, wie sie auch beim Menschen während einer Behandlung der HIV-Infektion gemessen wurde (77). Die Ergebnisse stimmen mit einem Einzelfallbericht überein, der einen HIV-positiven Patienten mit oraler Kandidose beschreibt, wobei der Erreger gegen die Antimykotika Fluconazol, Itraconazol, Amphotericin B und Nystatin resistent war. Die Infektion verschwand plötzlich, als seine HIV-Infektion zusätzlich mit Saquinavir behandelt wurde (162). In einer einjährigen prospektiven Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass die Prävention von wiederkehrenden oralen Kandidosen bei HIV-Patienten weitestgehend auf die Therapie mit Proteinaseinhibitoren zurückzuführen ist und dass nicht nur der verbesserte Immunstatus dafür ausschlaggebend ist, sondern eine direkte Hemmung der Sap von *C. albicans* eine Rolle spielen könnte (22). Die meisten der früheren Untersuchungen zeigen eine reduzierte Virulenz, aber keine komplette Avirulenz von *C. albicans* unter dem Einfluss von Pepstatin A oder den HIV-Proteinaseinhibitoren. Ein Grund dafür könnte die unvollständige Hemmung aller Sap Isoenzyme sein. Trotzdem scheinen die Sap ein wichtiger Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antimykotika zu sein. Durch die Erforschung der Röntgenkristallstrukturen aller zehn Sap-Isoenzyme sollte es

möglich sein, gezielt Proteinaseinhibitoren gegen die Sap zu entwickeln, die in dem jeweiligen Infektionsstadium und bei dem jeweiligen Infektionsort von Bedeutung sind.

1.4 Ziel der Arbeit

Zur Untersuchung der vaginalen Candidose werden meist Tiermodelle verwendet. Die am häufigsten verwendeten Tierarten sind Mäuse und Ratten. Um eine *C. albicans*-Infektion bei der Maus oder der Ratte etablieren zu können, müssen die Tiere mit Östrogenen vorbehandelt werden. Nach einer 3-7-tägigen Vorbehandlung werden die Tiere dann mit *C. albicans* infiziert. Neben den ethischen Bedenken stellen v.a. die mangelnde Übertragbarkeit vieler Ergebnisse auf den Menschen einen erheblichen Nachteil dar (8, 30, 41). Daher bietet ein *ex vivo*-Modell der vaginalen Candidose, basierend auf einer rekonstituierten humanen Vaginalschleimhaut, eine gute Alternative.

Ziel der Forschungsarbeit war es, ein *ex vivo*-Modell der vaginalen Candidose zu etablieren, anhand dessen der Einfluss der sekretorischen Aspartatproteinasen auf den Verlauf der vaginalen Infektion untersucht werden kann. Durch die Verwendung von *SAP*-Nullmutanten sollte die Funktion der einzelnen Sap näher charakterisiert werden. Außerdem wurden einige Proteinaseinhibitoren bezüglich ihrer Wirksamkeit gegenüber Sap von *C. albicans* und damit ihres Einflusses auf den Infektionsverlauf im rekonstituierten vaginalen Schleimhautmodell untersucht (131). Die Wirksamkeit der Proteinaseinhibitoren wurde durch die Untersuchung der chemischen Wechselwirkungen der Hemmstoffe mit dem aktiven Zentrum von Sap2 computergestützt aufgeklärt.

Die *ex vivo*-Ergebnisse bezüglich der *SAP*-Expression wurden mit denen mittels *in vivo*-Proben einer vaginalen Candidose gewonnenen verglichen.

Schließlich wurde auch die Wirtsantwort durch Zugabe von PMN simuliert und die damit verbundene Zytokinexpression auf Gen-Ebene gemessen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 *Ex vivo*-Virulenzuntersuchungen zu den Sap von *C. albicans*

2.1.1 *Ex vivo*-Vaginalschleimhautmodell

Um die Virulenz der einzelnen Sap zu untersuchen, wurde zunächst ein Modell der vaginalen Kandidose etabliert. Das humane Epithel für das *ex vivo*-Modell der vaginalen Kandidose wurde von der Firma Skinethic (Nizza, Frankreich) geliefert. Es besteht aus A431-Zellen, die von einem humanen Epidermoid-Karzinom der Vulva stammen (48, 117). Diese Zelllinie bildet durch *in vitro*-Kultivierung auf einem 0,5 cm² großen Polycarbonatfilter, der als Dermisersatz fungiert, ein mehrschichtiges Epithel ohne Stratum corneum, das der menschlichen Vaginalschleimhaut *in vivo* gleicht. Die Kultivierung dauert fünf Tage und findet in einem serum-, antibiotika- und antimykotikafreien MCDB 153 Spezialmedium (Clonetics, San Diego, USA) statt, das 5 µg/ml Insulin und eine Calciumkonzentration von 1,5 mM enthält. Die Dicke des Epithels beträgt am fünften Tag 64 µm. Es wurden jeweils zwölf gekühlte, 0,5 cm² große, sterile Epithelien in Alufolie verpackt geliefert. Zusätzlich wurde ein antibiotika- und antimykotikafreies Erhaltungsmedium mitgeliefert, das bei längeren Versuchen alle 24h gewechselt werden muss. Die infizierten und nicht infizierten Gewebekulturen wurden jeweils in 1ml Erhaltungsmedium gestellt und bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert.

2.1.2 Synchronisation der Stämme

Alle verwendeten *C. albicans*-Stämme wurden vor ihrer Verwendung im rekonstituierten humanen Vaginalepithel-(RHVE) Modell synchronisiert. Dazu wurden die eingefrorenen Stämme mit Hilfe einer Öse auf Sabouraud-Glukose-Agarplatten (Difco, Detroit, USA) überimpft und für 24h bei 37°C in einem Inkubator (Heraeus) angezchtet. Ein Teil der gewachsenen Kolonien wurde anschließend in 5ml steriler, 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung suspendiert und bei 1500 U/min (Rotanta/S, Hettich, Berlin, D; Rotor: 6775064) 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde weggekippt und der Waschvorgang mit 10ml 0,9%iger NaCl-Lösung zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand in 5ml destilliertem Wasser resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 2x10⁵ Zellen/ml wurden daraufhin in autoklaviertes YPD-Medium (*Yeast-Extract-Peptone-Dextrose*, Hefeextrakt-Pepton-Glukose, Difco, Detroit, USA)

eingimpft. Diese Suspension wurde für 16h bei 25°C und 150 U/min in einem Schüttelinkubator (HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Am nächsten Tag wurde wiederum die Zellzahl bestimmt und diesmal eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml mit frischem YPD eingestellt. Diese Suspension wurde für 24h bei 37°C und 150 U/min inkubiert. Abschließend wurde die Mischung dreimal mit jeweils 10 ml steriler Phosphat-gepufferter Kochsalz-Lösung (PBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) gewaschen. Die Inokulumgröße wurde mit PBS auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

2.1.3 Verwendete *C. albicans*-Stämme

Für die Wildtyp-Infektion des RHVE wurde der *C. albicans* Stamm SC5314 (50) verwendet. Außerdem wurden die bekannten $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - und $\Delta sap4-6$ -Mutanten (64) und die $\Delta sap1$ - und $\Delta sap2$ -Revertanten eingesetzt. Die *SAP*-Nullmutanten waren gezielt durch *gene-targeting* nach dem *URA-Blaster*-Protokoll konstruiert worden (45, 53). Dies hat den Vorteil, dass die niedrigere proteolytische Aktivität direkt auf das deletierte Gen zurückführbar ist und nicht wie bei den durch ungerichtete Mutationen (UV-Strahlung, Chemotherapie) zufällig erzeugten Mutanten auf eventuelle weitere Veränderungen des Erbgutes (62).

Die Konstruktion mehrerer isogener Mutanten gestaltet sich aufgrund des diploiden Charakters von *C. albicans* relativ schwierig, da immer beide Allele ausgeschaltet werden müssen. Bei den Revertanten wurden die deletierten Gene mit Hilfe eines Plasmids wieder in die Zelle eingeführt (Hube unpubliziert).

2.1.4 *Ex vivo*-Infektionsmodell

Das RHVE wurde in einer Laminar-Air-Flow-Box (Lamin Air, Heraeus) jeweils mit 50µl einer Stammsuspension infiziert. Zudem wurden Kontrollproben mit 50µl PBS angesetzt. Die einzelnen Inserts wurden in 1 ml Erhaltungsmedium gestellt, das bei längeren Versuchen alle 24h gewechselt werden musste. Die Proben wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator angezüchtet. Zu bestimmten Zeiten wurden jeweils Proben entnommen. Das Epithel mit Polycarbonatträgerschicht wurde dabei mit einem Skalpell aus dem Plastikinsert herausgeschnitten und halbiert. Ein Teil wurde für die weitere Untersuchung mittels Reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der andere Teil wurde in Karnovsky-Fixierung gelegt und für die histologischen und (immun-)elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendet. Das Erhaltungsmedium wurde ebenfalls schockgefroren und bei -80°C für spätere Zytokinbestimmungen oder LDH-Tests aufgehoben.

2.1.4.1 Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314

Das Epithel wurde jeweils mit 2×10^6 *C. albicans* Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 μ l PBS infiziert. Gleichzeitig wurden Kontrollproben mit 50 μ l PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 1, 3, 6, 12, 14, 22, 24 und 36h inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24h gewechselt.

Das Epithel wurde außerdem mit 2×10^6 *C. albicans* Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 μ l PBS unter Zugabe von konzentrierter Essigsäure infiziert. Der pH-Wert des Erhaltungsmediums wurde dabei ebenfalls mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt. Die entsprechenden Kontrollproben wurden ebenfalls auf pH 4,5 eingestellt. Die Inkubationszeit betrug 3, 6 und 12h.

2.1.4.2 Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und Proteinaseinhibitoren

Die rekonstituierte Vaginalschleimhaut wurde jeweils mit 2×10^6 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 μ l PBS infiziert. Des Weiteren wurden jeweils 50 μ l der oben erwähnten Stammsuspension zusätzlich entweder mit Pepstatin A (Sigma, Saint Louis, USA) (**Abb. 8**) in einer Konzentration von 15 μ M, mit Ritonavir (Abbott, Wiesbaden, D) (**Abb. 9**) in einer Konzentration von 32 μ M, mit Amprenavir (GlaxoSmithKline, Bad Oldeslohe, D) (**Abb. 10**) in einer Konzentration von 0,5 μ M oder mit einem peptidartigen Proteinaseinhibitor mit der Sequenz BocValValPstAla(3R,4R)PstOMe (Inh18) in einer Konzentration von 15 μ M, synthetisiert von Pichova et al. (108), versetzt. Die Kontrollen wurden nur mit PBS und dem entsprechenden Proteinaseinhibitor inkubiert. Die Infektionszeiten betragen 6, 12 und 24h für Pepstatin A und Ritonavir, 6 und 12h für Inh18 und 24h für Amprenavir. Die Konzentrationen der HIV-Proteinaseinhibitoren Amprenavir und Ritonavir entsprachen den Plasmaspiegeln, die bei oraler Gabe auch bei HIV-Patienten gemessen wurden (56, 59).

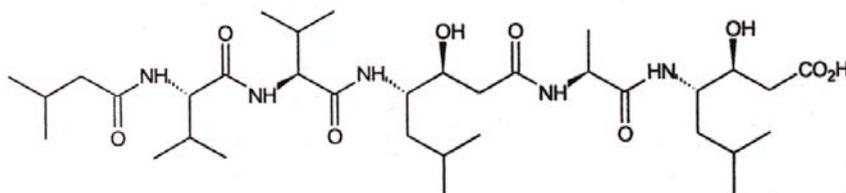


Abbildung 8. Strukturformel von Pepstatin A

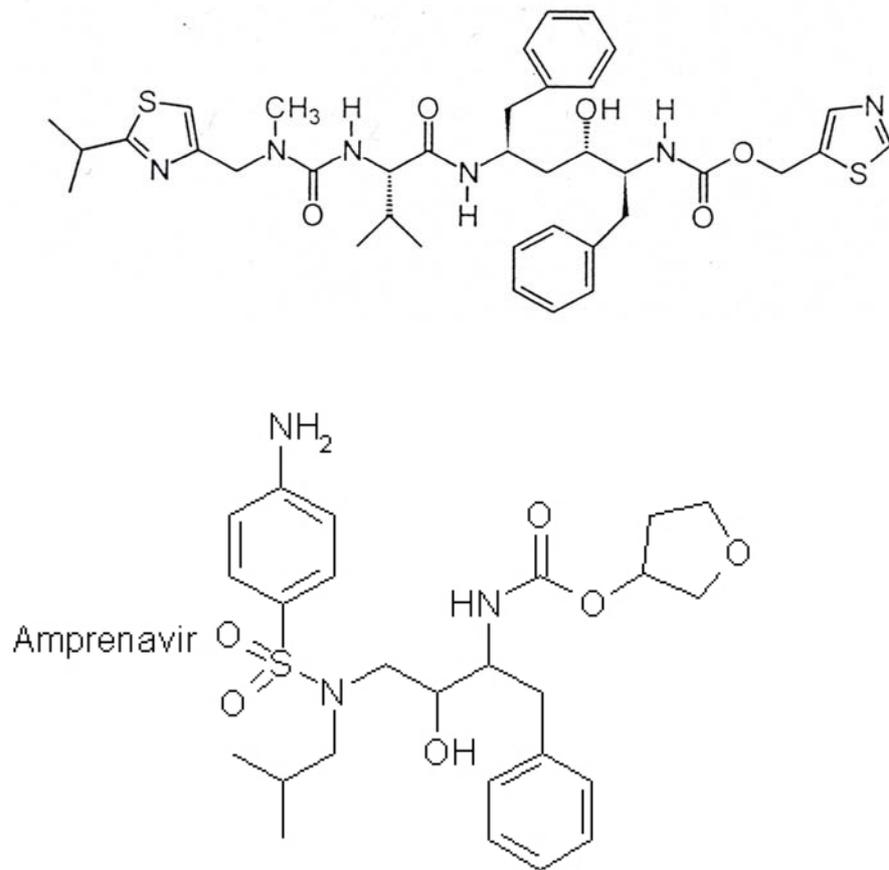


Abbildung 9-10. Strukturformel von Ritonavir und Amprenavir

2.1.4.3 Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und *Lactobacillus acidophilus*

Das Epithel wurde jeweils mit 2×10^6 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 μ l PBS und jeweils 1×10^7 *Lactobacillus acidophilus*-Zellen (Klösterl-Apotheke, München) infiziert. Die Kontrollen wurden nur mit 1×10^7 *Lactobacillus acidophilus*-Keimen in PBS inkubiert. Die Infektionszeit betrug 6 und 12h.

2.1.4.4 Infektion mit den *SAP*-Nullmutanten *Asap1*, *Asap2* und *Asap4-6*

Das Epithel wurde jeweils mit 2×10^6 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 oder der *Asap1*-, *Asap2*- oder *Asap4-6*-Mutante in 50 μ l PBS infiziert. Die nicht infizierten Kontrollen wurden nur mit 50 μ l PBS inkubiert. Die Infektionszeiten betragen 6, 12 und 24h.

2.1.4.5 Infektion mit den *Asap1*- und *Asap2*-Revertanten

Das Epithel wurde jeweils mit 2×10^6 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 oder 2×10^6 Zellen der *Asap1*- oder *Asap2*-Revertanten in 50 μ l PBS infiziert. Die Dauer der Infektion betrug 6 und 12h.

2.1.4.6 Exposition gegenüber den Enzymen Sap1 und Sap2

Das RHVE wurde mit Sap2 in einer Konzentration von 1 und 2,5 μ g pro 50 μ l PBS für 3, 6 und 8h infiziert. Außerdem wurde das Gewebe für 8h mit Sap1 in einer Konzentration von 2 μ g pro 50 μ l PBS inkubiert. Die entsprechenden Kontrollproben wurden nur mit 50 μ l PBS inkubiert. Sap1 und 2 war in dem Mikroorganismus *P. pastoris* hergestellt worden, das ein Plasmid enthält, welches *SAP1* und *SAP2* überexprimiert (12).

2.1.4.7 Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und PMN

Das Epithel wurde jeweils mit 2×10^6 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 μ l PBS infiziert. 5h vor Ende der Infektionszeit wurden 4×10^6 neutrophile Granulozyten dazugegeben. Die Infektionszeit betrug 12 und 24h. Die Kontrollproben wurden mit 50 μ l PBS inkubiert.

Die PMN wurden aus menschlichem Blut isoliert. Dazu wurden 40 ml menschliches Blut abgenommen und dieses mit Heparin versetzt, um eine Gerinnung zu vermeiden. Bei der Gewinnung von Zellen aus menschlichem Blut macht man sich das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation zunutze. Boyum beschrieb als Erster 1968 die Isolierung von mononukleären Zellen aus zirkulierendem Blut und Knochenmark (14). Dabei wird eine Lösung aus Polysaccharose und einem strahlenundurchlässigen Kontrastmittel mit einer Dichte von 1,077 verwendet (Histopaque-1077; Sigma, Saint Louis, USA). Diese bewirkt das Ansammeln der mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Plasma und Histopaque-1077. Um die PMN abzutrennen, wird zusätzlich eine zweite Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat (Histopaque-1119; Sigma) mit einer Dichte von 1,119 verwendet. Diese beiden Lösungen werden vorsichtig übereinander geschichtet, wobei zuerst 10 ml der Lösung mit der höheren Dichte (Histopaque-1119) in ein dickes Zentrifugenröhrchen gegeben wird und anschließend 10 ml Histopaque-1077 dazu pipettiert wird. Dadurch wird ein doppelter Gradient gebildet (36). Die beiden Lösungen werden mit 20 ml Vollblut überschichtet. Anschließend wird die Mischung 30 Minuten bei $700 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei sammeln sich die Zellen je nach Dichte in den unterschiedlichen Schichten an (**Abb. 11**). Die Schicht mit den Neutrophilen wird mit einer Pipette abpipettiert und dreimal mit 10 ml Zellkulturmedium RPMI 1640 mit fetalem Rinderserum

(Sigma) gewaschen. Daraufhin werden die PMN mit Hilfe der Neugebauer-Zählkammer gezählt und mit RPMI 1640 auf die gewünschte Zellzahl von 8×10^7 Zellen/ml gebracht.

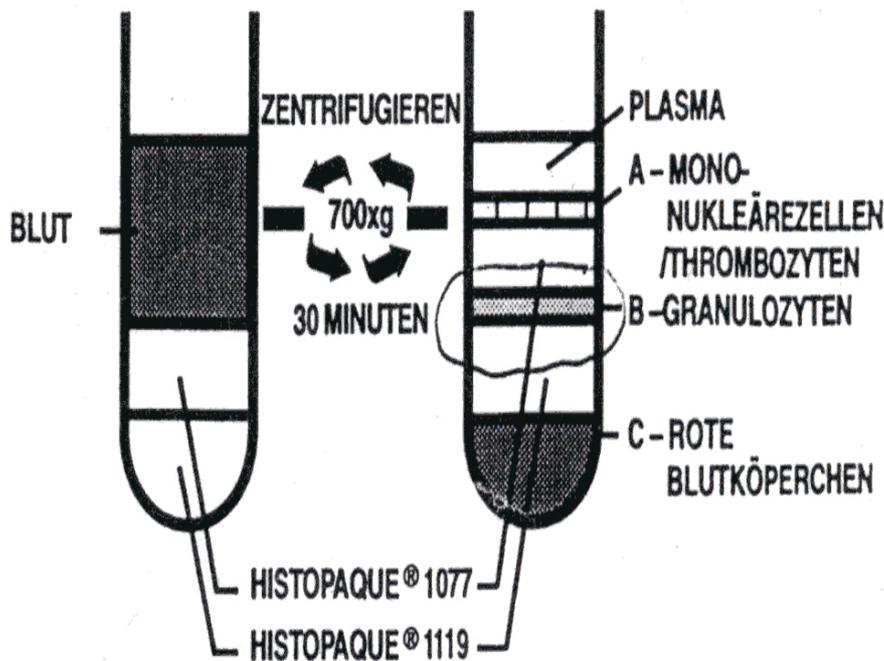


Abbildung 11. Auftrennung der Blutzellen nach ihrer Dichte zur Isolierung von PMN.

2.1.5 Fixierung und Einbettung

Für die histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde das Epithel im Anschluss an die Infektion fixiert. Dazu wurden die Proben für mindestens fünf Stunden bei 4°C in eine nach Karnovsky modifizierte Lösung gelegt. Diese besteht aus 2,5%iger Glutaraldehyd- (Serva, Heidelberg) und 2,0%iger Formaldehyd-Lösung (Merck) in 0,1 M Phosphatpuffer (Merck) mit einem pH-Wert von 7,3 (69). Anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur abpipettiert und dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer für jeweils 15 Minuten gespült. Die Nachfixierung des Epithels erfolgte eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 1% Osmiumtetroxid- (OsO_4 , Serva) Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer. Danach wurde die Haut noch zweimal für jeweils 15 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die Entwässerung der Schleimhaut erfolgte, indem man die Proben nacheinander für jeweils 15 Minuten in steigende Alkoholkonzentrationen, bestehend aus 30, 50, 70, 90% und schließlich absolutem Ethanol (Apotheke der Innenstadt-Kliniken der LMU, München), legte. Für die folgende Glycidethereinbettung nach Luft (79) musste zunächst eine flüssige Kunstharzlösung hergestellt werden, die sich aus mehreren

Komponenten zusammensetzt. Komponente A enthält 62 ml Glycidether (Serva) und 100 ml Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (Serva). Komponente B setzt sich aus einer Mischung von 100 ml Glycidether (Serva) und 89 ml Methylnadicanhydrid (Serva) zusammen. Nach intensiver Mischung der beiden Komponenten A und B im Verhältnis 2:3 wurde abschließend noch der Polymerisationsbeschleuniger p-Dimethylaminomethylphenol (Serva) in 1,5%iger Konzentration zugesetzt. Die Proben wurden zunächst 60 Minuten in eine Mischung des oben beschriebenen Kunstharzes und absoluten Ethanol im Verhältnis 1:1 gegeben. Anschließend wurden das Kunstharz und der absolute Ethanol im Verhältnis 2:1 gemischt und die Proben zwei Stunden in diese Mischung gelegt. Danach legte man die Proben in die reine Kunstharzmischung. Nach drei Stunden erneuerte man diese Kunstharzmischung und ließ die Proben über Nacht im Kühlschrank stehen. Am nächsten Tag wurden die in der Kunstharzmischung liegenden Schleimhautproben für eine Stunde auf 37°C erwärmt, um den restlichen Alkohol aus den Proben zu entfernen. Anschließend wurde das Epithel unter der Lupe mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten und in mit flüssiger Kunstharzmischung gefüllte Einbettungsformen gelegt, die dann zur Aushärtung des Harzes für 7 Tage bei 60°C im Trockenschrank (WTB Binder, Tuttlingen) aufbewahrt wurden. Nach erfolgter Aushärtung konnten die einzelnen Kunstharzblöcke auf die optimale Größe getrimmt werden (Ultracut, Reichert, Wien, Österreich).

2.1.6 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden aus den getrimmten Kunstharzblöcken mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert) Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1 µm angefertigt. Diese wurden mit einer frisch hergestellten Mischung aus 1%iger Pyronin G Lösung (Merck) und 1%igem Toluidinblau (Merck), gepuffert mit 1% Dinatriumtetraborat (Borax, Na₂B₄O₇), im Verhältnis 1:4 für fünf Minuten bei 60°C auf einer Heizplatte (Medax, München) gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden bei 60°C getrocknet und anschließend mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet.

2.1.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden aus den getrimmten Kunstharzblöcken mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut S, Reichert) und Diamantmessern Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80 nm angefertigt. Anschließend erfolgte eine Kontrastierung mit 0,5%igem Uranylacetat (Leica, Bensheim) bei 30°C für 20 Minuten sowie mit 2,7%igem Bleicitrat (Leica) für 10 Minuten in einem Ultrastainer (Leica). Die Auswertung der Schnitte wurde

mit einem EM 902-Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV und einer Vergrößerung zwischen x2400 und x85000 durchgeführt.

2.1.8 Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen

Zum Nachweis von intrazellulär und auch extrazellulär gelegenen Sap-Antigenen wurden Proben nach 24 h dauernder Infektion mit dem *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 immunelektronenmikroskopisch aufgearbeitet. Dabei erfolgte die Markierung der Schnitte nach dem *Postembedding-Immunogold-Labeling*-Verfahren (96). Die Proben wurden zunächst 3,5h in einer 0,1 M Phosphatpufferlösung (Merck), die 2% Formaldehyd (Merck) enthielt, fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in LR-White Medium (London Resin; London, England) eingebettet und das Kunstharz bei 50°C zwei Tage ausgehärtet. Nach der Anfertigung von Ultradünnschnitten (60-80 nm) mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut S, Reichert) wurden diese auf ein befilmtes Nickelnetzchen aufgebracht und 10 Minuten lang mit destilliertem Wasser sowie 2 x 10 Minuten mit 5%igem Ziegen Serum, gelöst in PBS, gespült. Die Schnitte wurden danach mit dem gegen Sap1-3 gerichteten, polyklonalen Kaninchenantikörper α -Sap2 (12) 1:100 verdünnt, oder mit dem gegen Sap4-6 gerichteten, polyklonalen Kaninchenantikörper α -Sap6 (12), 1:80 verdünnt, inkubiert. Die Verdünnung erfolgte mit PBS Lösung (Gibco), die 1% Ovalbumin (Sigma), 0,1% Tween 20 (Merck) und 0,015 M Natriumazidlösung (Merck) enthielt. Die Netzchen mit den Schnitten wurden über Nacht mit PBS gewaschen und am nächsten Tag mit einem 10 nm-goldpartikelmarkierten Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Auroprobe, EM Immunogold Reagents, Amersham, Little Chalfont, Großbritannien) für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper mussten zuvor mit 0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 8,2 (Merck), der zusätzlich 0,45 M NaCl (Fluka), 0,015 M Natriumazid (Merck), 1% Ovalbumin (Sigma) und 0,1% Tween 20 (Merck) enthielt, 1:50 verdünnt werden. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut mehrmals mit der oben genannten Tris-HCl-Lösung gewaschen und mit 2%igem Glutaraldehyd in PBS für 15 Minuten nachfixiert. Die Reste der Fixierlösung wurden anschließend durch 3 x Waschen mit Aqua destillata entfernt. Zuletzt erfolgte die Kontrastierung der Schnitte mit 0,5%igem Uranylacetat (Leica) für 7 Minuten bei 30°C sowie mit 2,7%igem Bleicitrat (Leica) für 3 Minuten bei 20°C in einem Ultrastainer (Leica). Die Begutachtung der Schnitte wurde mit einem EM 902-Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss) bei 80 kV und Vergrößerungsstufen zwischen x 3000 und x 50000 durchgeführt.

2.1.9 *SAP*-Genexpressionsstudien mittels RT-PCR

Um die Rolle der verschiedenen Isoenzyme bei den unterschiedlichen Infektionsstadien zu untersuchen, wurden *SAP*-Genexpressionsuntersuchungen durchgeführt. Dabei musste zunächst einmal die gesamte RNA nach der Infektion aus den Zellen isoliert werden. Da nur die enthaltenen 5% mRNA (*messenger* RNA) bei der Proteinbiosynthese durch Translation in die entsprechenden Aminosäuren übersetzt werden, war es günstig, nur die mRNA in cDNA (*complementary* DNA) zu übersetzen. Dies ist möglich durch die Verwendung eines Oligo-(dT)-Primers (Gibco), der selektiv mRNA in cDNA umschreibt. mRNA besteht am 3'-Ende aus einer Kette von Adenosinresten. Der komplementäre Oligo-(dT)-Primer, der aus Desoxythymidin-Nukleotiden besteht, lagert sich am 3'-Ende der mRNA an und wandelt diese mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (Superscript, Gibco) in cDNA um. Mit Hilfe von *SAP*-spezifischen Primern wurde daraufhin die cDNA mittels PCR amplifiziert. Die enthaltenen *SAP* Gene konnten anschließend durch Ethidiumbromid-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen werden (**Abb. 12**)(25).

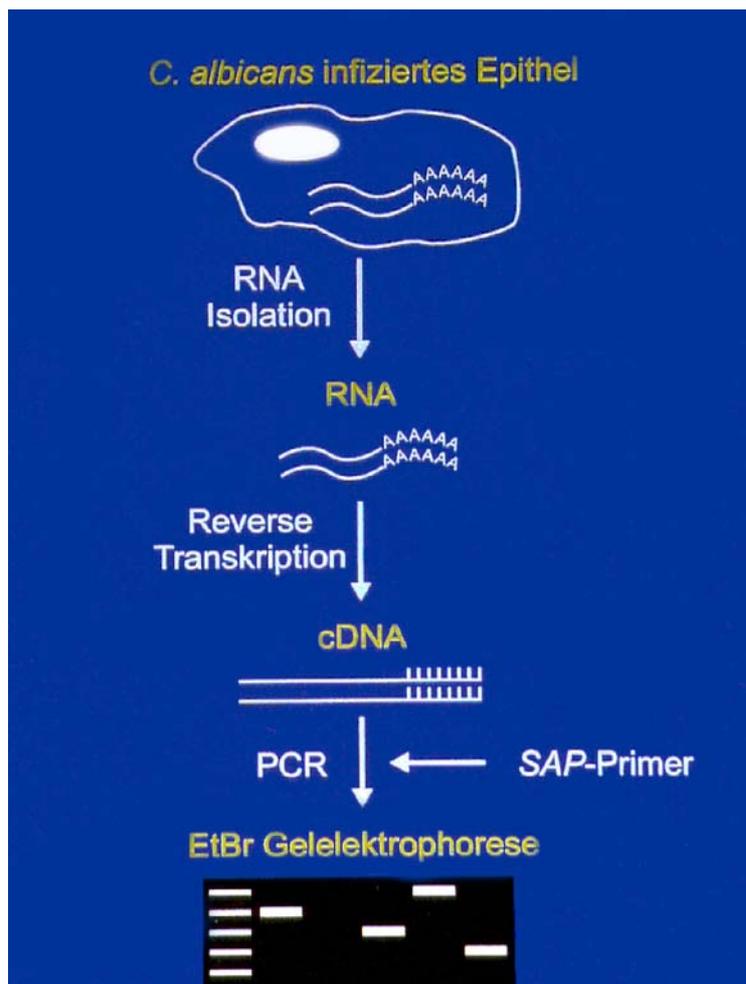


Abbildung 12. RT-PCR Methode zum Nachweis der *SAP*-Gene auf mRNA Ebene

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), die Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entwickelt wurde (93), ist eine enorm empfindliche Methode, mit der es möglich ist, einzelne DNA Abschnitte nachzuweisen, indem diese millionenfach kopiert werden. Sie besteht aus drei wesentlichen Schritten (**Abb. 13**). Zuerst müssen die Basenpaarungen der Ziel-DNA (*template*) durch Erhitzen auf ca. 95°C denaturiert bzw. gelöst werden, so dass Einzelstränge entstehen, die dann in der nächsten Syntheserunde als Matrize dienen. Im nächsten Schritt, der sog. Hybridisierung, lagern sich die zugesetzten Primer an die komplementären Enden der Einzelstrang DNA an. Dieser Schritt bestimmt die Spezifität der PCR. Die angelagerten Primer sind in der Regel 20-30 Nukleotide lang. Die Hybridisierungstemperatur liegt in der Regel zwischen 45 und 60°C und hängt vom Verhältnis der Nukleotide Guanosin/Cytidin zu Adenosin/Thymidin ab. Als letzter Schritt folgt die DNA-Synthese, die auch als Polymerisierung bezeichnet wird. Die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert bei 72-74°C in Gegenwart von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP`s) die Primer entlang des *templates*. Diese drei Schritte werden je nach gewünschter Menge an DNA 25-50-mal wiederholt. Dabei entstehen maximal 2^n Kopien des gewünschten DNA-Fragments, wobei n die Zahl der Versuchszyklen darstellt (15, 33).

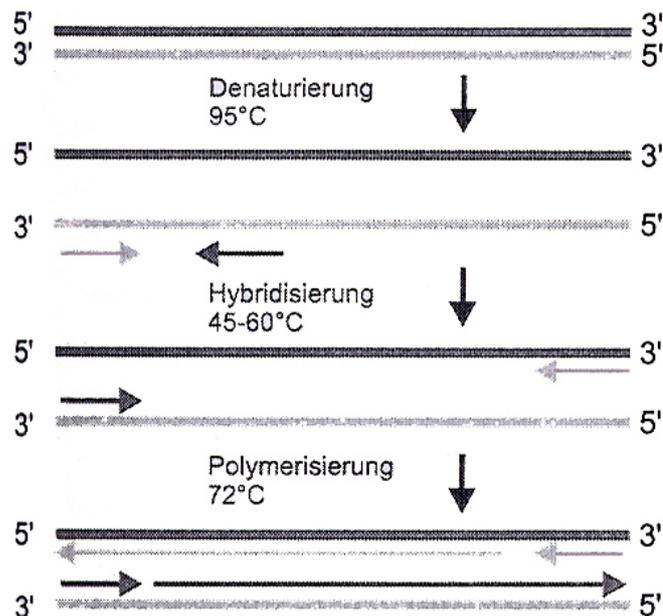


Abbildung 13. Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus (33)

2.1.9.1 RNA-Aufarbeitung

Für die Genexpressionsstudien musste die RNA sowohl aus infizierten als auch aus nicht infizierten Epithelien isoliert werden. Dies gestaltet sich bei Pilzzellen

im Gegensatz zu humanen oder tierischen Zellen relativ schwierig, da Pilze eine sehr stabile Zellwand besitzen. Die RNA-Extraktion besteht aus fünf wesentlichen Schritten: Homogenisieren, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen der RNA und Lösen der RNA. Zum Homogenisieren wurden die bei -80°C schockgefrorenen Proben zuerst einmal mit 1 ml peqGOLD RNAPure (PeqLab; Erlangen) versetzt. Diese Lösung enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Zusätzlich wurden 0,5 g Glaskügelchen (Sigma) mit einem Durchmesser von 425-600 μm dazugegeben und das Gemisch zum Aufschließen der Zellen für 10 Minuten geschüttelt. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Anschließend wurden 200 μl Chloroform dazugegeben und die Proben 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt, danach wurden sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine 5-minütige Zentrifugation bei 12000 x g in einer Kühlzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus; Rotor 3324) bei 20°C führte zur Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA reichert sich ausschließlich in der wässrigen Phase an, während DNA und Proteine sich in der Interphase und der Phenol-Chloroform-Phase befinden. Die wässrige Phase mit RNA wurde daraufhin in ein neues Röhrchen (*Tube*) überführt und mit 0,5 ml Isopropanol (Sigma) und 10 μl Glykogen (Amersham) versetzt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 Minuten bei 12000 x g in einer Kühlzentrifuge (Biofuge fresco) bei 4°C zentrifugiert. Dies führte zur Ausfällung der gelartigen RNA am unteren Ende des Röhrchens. Der Isopropanol-Überstand wurde weggekippt und die RNA zweimal mit 1 ml 75% Ethanol (Apotheke der Innenstadtkliniken der LMU) gewaschen und zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde anschließend leicht getrocknet und danach in 1 μl RNase Inhibitor (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, USA) und 8 μl Diethylpyrocarbonat (DEPC; Sigma)-Wasser gelöst. DEPC und RNase-Inhibitor verhindern die Kontamination mit RNasen, das sind Enzyme, die RNA zersetzen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Mit Hilfe eines RNA Gels wurde überprüft, ob nicht degradierte Gesamt-RNA isoliert wurde. Dazu wurden 2 μl RNA Lösung mit 5 μl RNA-Loading-Buffer (Sigma), der u.a. Ethidiumbromid enthält, versetzt. Die Mischung wurde 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gelegt. Zugleich stellte man ein RNA-Gel aus 1,5 g Agarose (Sigma), 73 ml DEPC-Wasser, 10 ml 10fach konzentrierter MOPS-Lösung [41,8 g Morpholinpropansulfat (Sigma), 16,7 ml 3 M Natriumacetatlösung (Sigma), 20 ml 0,5 M EDTA pH 8 (Sigma) ad 1 l DEPC-Wasser] und 16,2 ml 37%igem Formaldehyd (Merck) her. Die gesamte Mischung konnte nun direkt in die Taschen des erstarrten Gels pipettiert werden. Das beladene Gel musste nun 1 h in einer Gelkammer (Biorad, München), die mit 1fach konzentrierter MOPS-Lösung gefüllt war, bei 100 V entwickelt

werden. Anschließend erfolgte die Auswertung der Banden mit Hilfe einer UV-Lampe (Biometra, Göttingen) bei 311 nm.

Nachdem man sichergestellt hatte, dass man keine degradierte RNA erhalten hat, wurde der RNA-Gehalt in einem Photometer (Bio Photometer, Eppendorf) gemessen. Dazu wurde 1 µl RNA-Lösung in eine Quarzküvette gegeben und die Probe bei 260 und 280 nm vermessen. Zuvor wurde ein Nullabgleich gegen DEPC-Wasser mit RNase-Inhibitor durchgeführt. Durch die Messung der Absorption bei 260 nm kann direkt der Gehalt an Gesamt RNA ausgerechnet werden, indem man folgende Formel verwendet:

$$A_{260 \text{ nm}} \times 100 \times 40 = \text{Konz. } [\mu\text{g/ml}]$$

Durch das Verhältnis der Absorption 260 nm/280 nm kann man untersuchen, ob die RNA mit Proteinen, Guanidinisothiocyanat oder Phenol kontaminiert ist, die die RT-Reaktion stören würden. Für eine optimale RNA-Isolierung sollte das Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0 liegen (25). Ansonsten musste noch ein weiterer Waschvorgang mit Ethanol durchgeführt werden. Für die RT-Reaktion wurden immer 2 µg Gesamt-RNA verwendet.

2.1.9.2 RT-Reaktion

2 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl DNase I (Gibco), 6 µl DEPC Wasser und 1 µl DNase-Puffer (Gibco), bestehend aus 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl, 20mM MgCl₂, versetzt, um die eventuell noch vorhandene DNA zu zersetzen. Die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 µl 25 mM EDTA Lösung versetzt, um die überschüssigen Metallionen zu binden. Durch Erwärmen des Gemischs auf 65°C wurde die DNase I inaktiviert. Anschließend wurde die Mischung gekühlt. Für die eigentliche RT-Reaktion wurden die Proben zunächst mit 1 µl 10 mM dNTP Mix (Gibco) und 1 µl Oligo-(dT)-Primer (Gibco) versetzt. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 65°C für 5 Minuten. Nach kurzer Abkühlung wurde den Proben 2 µl 10fach konzentrierter RT-Puffer (Gibco; 200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 4 µl 25mM MgCl₂ Lösung (Gibco), 2 µl 0,1 M DTT (Gibco) und 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScript II RT; Gibco) zugesetzt. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 Minuten. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Die verbleibende RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNase H (Gibco) bei 37°C innerhalb von 20 Minuten abgebaut. Das entstandene cDNA-Gemisch konnte nun direkt für die PCR verwendet werden. Als Beweis für eine erfolgreiche RT-Reaktion wurde bei der RT-Reaktion immer auch Kontroll-RNA (Gibco) in cDNA umgewandelt. Um die Anwesenheit von genomischen DNA-Verunreinigungen auszuschließen, erfolgte die cDNA-Synthese auch ohne Zusatz der Reversen Transkriptase.

2.1.9.3 PCR-Methode

Folgende Primerpaare wurden für die *SAP*-spezifische Genexpression verwendet (**Tabelle 1**):

Primer für	Nukleotidsequenz	Fragmentgröße
<i>SAP1</i> :	5'-GATGTCATTA AAAACTCCTGTTAATG-3' und 5'-CCAGTTTCAATTCAGCTTGG-3'	783 bp
<i>SAP2</i> :	5'-CTCCTAAAGCATTCCCAGTTAC-3' und 5'-CATCATCACCTTGTAAGAAGC	915 bp
<i>SAP3</i> :	5'-CATGTCAAGCTGGTCAAGGAC-3' und 5'-ATAGGCTGATCTCAAGAAATTATC-3'	802 bp
<i>SAP4</i> :	5'-GTTCCAGATTCAAATGCCG-3' und 5'-CTTGAGCCATGGAGATCTTTC-3'	870 bp
<i>SAP5</i> :	5'-TGAGACTGGTAGAGATGGTG-3' und 5'-GGTTTACCACTAGTGTAATATGT-3'	902 bp
<i>SAP6</i> :	5'-AAACCAACGAAGCTACCAGAAC-3' und 5'-TAACTTGAGCCATGGAGATTTTC-3'	605 bp
<i>SAP7</i> :	5'-GATAAGGCATCAGGTACTATGG-3' und 5'-AGGAACAACGGCATGGTTATC-3'	866 bp
<i>SAP8</i> :	5'-CTGTTATTGTTGACACAGGTTC-3' und 5'-GTAGAAATACTTGAAGAAGTAGTG-3'	903 bp
<i>SAP9</i> :	5'-CACCAT AAGCAACGTGACTG-3' und 5'-GCGAAAGCAACAACCCATAC-3'	898 bp
<i>SAP10</i> :	5'-ACGTCAGAAGACTTTTCCATTG-3' und 5'-ATATGGCGATCCATGAACGTG-3'	938 bp

Tabelle 1: Primerpaare zum Nachweis der einzelnen *SAP*-Gene von *C. albicans*

Für die PCR wurde ein 50 µl Ansatz, bestehend aus 5 µl 5fach konzentriertem Puffer A (Gibco), 5 µl 5fach konzentriertem Puffer B (Gibco), 1 µl dNTP Mix (Gibco), jeweils 2,5 µl des 5 µM Primerpaares, 1 µl cDNA, 32 µl DEPC-Wasser und 1 µl Elongase (Gibco), hergestellt. Elongase besteht aus einem Gemisch aus

Taq und *Pyrococcus* Spezies DNA-Polymerasen. Die Proben wurden für die PCR in einen Thermocycler (iCycler; Biorad) gestellt. Es wurde für alle SAP-Genexpressionsstudien folgendes PCR-Protokoll mit 35 Zyklen verwendet:

- **Denaturierung:** 1 Minute bei 95°C
- **Hybridisierung:** 1 Minute bei 60°C
- **DNA-Synthese:** 1 Minute bei 72°C

Um Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde das konstitutiv exprimierte Gen *EFB1*, das für den Elongationsfaktor EF-1 β kodiert (84), als interne Kontrolle verwendet.

Es wurden Primer konstruiert (5'-TTCTTCAACAGCAGCTT-GTAAGTC-3' und 5'-AGTCATTGAACGAATTCTTGGCTG), um ein 891 bp großes Fragment des EFB1-Gens nachweisen zu können. Dieses Gen weist, wenn es aus genomischer DNA amplifiziert wird, ein Intron mit einer Länge von 365 bp auf. Wird das Fragment allerdings aus cDNA amplifiziert, so sind die Introns bereits durch Spleißen entfernt worden. Das entsprechende Fragment aus cDNA ist somit nur noch 526 bp lang. Man kann damit genau differenzieren, ob die erhaltenen Signale von genomischer DNA oder von durch RT-Reaktion gewonnener cDNA stammen.

2.1.9.4 cDNA-Ethidiumbromid-Gelelektrophorese

Zur Auswertung der amplifizierten *SAP*-Gene wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 1%iges Agarosegel aus 1g Agarose (Gibco) ad 100g TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA; Gibco) hergestellt. Die Proben wurden mit 20 μ l LBIII-Farbstoff (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und geschüttelt. 15 μ l des Proben-Farbstoff-Gemisches wurde in die Taschen des Gels pipettiert. In eine Tasche wurden 7 μ l des DNA-Größenmarkers peqGOLD DNA-Sizer XIII (PeqLab, Erlangen) pipettiert. Das beladene Gel wurde 1 h bei 100 V in einer Gelkammer (Biorad) entwickelt, die mit 1fach konzentrierter TAE-Lösung gefüllt war. Anschließend wurde das Gel zum Anfärben der Banden für 30 Minuten in eine Lösung aus Ethidiumbromid in TAE gebracht. Daraufhin konnten die Banden unter einer UV-Lampe (Biometra) bei 311 nm ausgewertet werden.

2.2 LDH-Test

Die Laktatdehydrogenase ist ein Enzym, das die Reduktion von Pyruvat zu Laktat bei der Glykolyse katalysiert. Das Coenzym dabei ist NADH (**Abb. 14**). LDH ist aus vier Polypeptidketten aufgebaut. Es existieren fünf Isoenzyme, deren Verteilung für verschiedene Organe charakteristisch ist. Kommt es zu

einer Schädigung der Zellen, wie zum Beispiel beim Herzinfarkt, so erhöht sich der LDH-Spiegel im Serum. Werden die Zellen der Vaginalschleimhaut geschädigt, so kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der LDH-Konzentration im Erhaltungsmedium. Diese Konzentration kann über die Messung der NADH-Abnahme photometrisch bei 340 nm nach der Wróblewski-La Due-Methode (159) bestimmt werden. Es wurden die Erhaltungsmedien nach der Infektion des RHVE mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 mit und ohne *Lactobacillus acidophilus*-Zellen (s. 2.1.4.1 bzw. 2.1.4.3), mit der *Δsap1*- und *Δsap2*-Mutante (s. 2.1.4.4), mit der entsprechenden Revertante oder nur mit PBS (Kontrolle) nach verschiedenen Infektionszeiten auf ihre LDH-Konzentration hin untersucht.

LDH



Abbildung 14. Reaktion von Laktat zu Pyruvat bei der Glykolyse

2.3 Statistische Analysen

Die statistische Signifikanz bei der Auswertung der immunelektronenmikroskopischen Proben wurde mit dem Fisher-Pitman-Test geprüft (74). Dabei wurde ein p-Wert von weniger als 0,05 für signifikant gehalten.

2.4 Ex vivo-Untersuchungen zur Zytokinexpression bei der vaginalen Kandidose

Um die Wirtsantwort auf eine *C. albicans* Infektion zu untersuchen, wurde die Expression von *IL-8* untersucht. Hierzu wurde die Schleimhaut für 1, 3 und 6 h mit 2×10^6 Zellen des WT SC5314 in 50 μl PBS infiziert. Anschließend wurde aus den Proben die RNA aufgereinigt und durch eine RT-Reaktion in cDNA umgewandelt. Die cDNA wurde daraufhin in einer PCR mit spezifischen Primern für *IL-8* vervielfältigt und die entsprechenden Banden in einem mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel ausgewertet. Als Kontrolle diente das RHVE, das entsprechende Zeiten lang mit 50 μl PBS inkubiert wurde. Als Kontrolle für die erfolgreich verlaufene PCR und RT-Reaktion dienten wiederum die Gene *EFB1* und *EFB1* genomisch. Der *IL-8* Primer hatte folgende Sequenz (**Tabelle 2**):

Primer für	Nukleotidsequenz	Fragmentgröße
<i>IL-8</i>	5`-GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAG-3` und 5`-GCATCTGGCAACCCTACAACAG-3`	365 bp

Tabelle 2: Primerpaar zum Nachweis von Interleukin 8

Die PCR verlief nach folgendem Protokoll mit 35 Zyklen:

- **Denaturierung:** 1 Minute bei 95°C
- **Hybridisierung:** 1 Minute bei 65°C
- **DNA-Synthese:** 1 Minute bei 72°C

Die *IL-8* Expression wurde aber nicht nur auf mRNA-Ebene untersucht, sondern zudem noch auf Proteinebene. Dabei wurde das RHVE für 12 h mit 2×10^6 Zellen des *C. albicans* Wildtyps SC5314 infiziert und anschließend die Proteinmenge an IL-8 im Erhaltungsmedium gemessen. Außerdem wurde die IL-8-Konzentration bei Proben gemessen, die zusätzlich zu *C. albicans* noch mit Pepstatin A oder Ritonavir (s.2.1.4.2) oder mit PMN (s. 2.1.4.7) versetzt wurden. Hierzu verwendete man einen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) mit einer optimalen Konzentration eines monoklonalen Antikörpers der Maus (G265-5; PharMingen, San Diego, CA, USA), gerichtet gegen menschliches IL-8, und einen biotinylierten monoklonalen Antikörper der Maus (G265-8; PharMingen), ebenfalls gegen menschliches IL-8 gerichtet, als detektierende Antikörper. Eine Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurde über Nacht mit dem gegen humanes IL-8 gerichteten monoklonalen Antikörper versetzt. Nachdem nicht spezifische Bindungsseiten blockiert worden waren, wurde das Erhaltungsmedium auf die Platte gegeben und über Nacht inkubiert. Nach einigen Waschvorgängen wurde der biotinmarkierte, gegen menschliches IL-8 gerichtete monoklonale Antikörper dazugegeben. Schließlich wurde ein alkalischer Avidin-Biotin-Phosphatase-Komplex (DAKO, Glostrup, Dänemark) dazugegeben. Um die Signale zu erfassen, wurde die Platte mit dem Farbstoff p-Nitrophenylphosphatdinatrium (Sigma) inkubiert, und die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 405 und 490 nm bestimmt. Die IL-8-Konzentration wurde dann über den linearen Bereich der entsprechenden Standardkurven von rekombinatem IL-8 (PharMingen) bestimmt.

2.5 In vivo-Untersuchungen zur Expression der sekretorischen Aspartatproteinasen von *C. albicans*

Um zu prüfen, inwieweit die *ex vivo*-Ergebnisse des RHVE-Modells mit der *in vivo*-Situation übereinstimmen, wurden Abstriche von Patientinnen mit Verdacht auf eine Vulvovaginal-Kandidose auf ihre *SAP*-Expression hin untersucht. Das Abstrichmaterial wurde von Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, nach deren Einverständnis gewonnen.

Ein Teil des gewonnenen Abstrichmaterials der Patientinnen wurde für mikrobiologische Untersuchungen verwendet. Dazu wurden die Proben auf Kimmig-Agar aufgebracht und für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine biochemische Charakterisierung, basierend auf dem System ATB 32 C (API System, Bio Mérieux, La Balme-les-Grottes, Montalieu Vercieu, Frankreich). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Erregern um *C. albicans* handelte.

Der andere Teil der Proben wurde direkt nach der Entnahme auf die *SAP*-Genexpression mittels RT-PCR untersucht (s. 2.1.9).

2.6 Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von Sap2

Wenn man nach Proteinaseinhibitoren zur Behandlung von *C. albicans*-Infektionen sucht, ist es wichtig, sich die dreidimensionale Struktur der Sap genau anzuschauen. Das aktive Zentrum ist hier von besonderer Bedeutung. Um ein dreidimensionales Bild von Molekülen zu erhalten, wird häufig die Röntgenkristallstrukturanalyse verwendet. Die erste Kristallstrukturanalyse wurde 1913 von Bragg et al. durchgeführt. Sie bestimmten damals die Kristallstruktur von Kochsalz. Bei dieser Strukturanalyse wird ein Kristall mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Strahlen werden durch das Auftreffen auf den Atomen unterschiedlich stark gebeugt. Zur Vermessung eines Kristalls muss man jede der Ebenenscharen eines Kristalls so zum Röntgenstrahl orientieren, dass sie zur Reflexion kommt. In Abhängigkeit vom relativen Winkel zum Röntgenstrahl vermisst man die Intensität der reflektierten Röntgenstrahlung (11). Heutzutage ist man in der Lage, die Struktur von Proteinen mit 4000 Aminosäuren aufzuklären. Zwei Arbeitsgruppen gelang es bisher, die dreidimensionale Struktur von Sap2 in Kombination mit einem Inhibitor röntgenkristallografisch darzustellen (1, 27). Mit Hilfe von modernen Grafikcomputern und den entsprechenden Rechenprogrammen lässt sich das Enzym am Bildschirm visualisieren. Dazu werden die nötigen Strukturdaten aus der Proteindatenbank (PDB) im Internet entnommen (112) und in die entsprechenden Grafikprogramme übertragen, die daraufhin ein dreidimensionales Bild entwerfen.

Ich habe versucht, die aufgrund der Röntgenstrukturanalyse von Cutfield et al. erhaltene dreidimensionale Struktur von Sap2 mit dem Inhibitor A70450 mit Hilfe eines Computerprogramms (SYBYL 6.2; Tripos Associates, St. Louis, USA) zu optimieren. Mit Hilfe von Molecular-Modelling-Methoden habe ich anschließend herausgefunden, wie verschiedene Proteinaseinhibitoren im aktiven Zentrum angeordnet sind und welche Wechselwirkungen entstehen.

2.6.1 Optimierte Struktur von Sap2 mit Pepstatin A

Nachdem die Struktur von Sap2 mit A70450 mit Hilfe des Molecular-Modelling-Programms SYBYL 6.2 (Tripos Associates) optimiert wurde, wurde Pepstatin A ins aktive Zentrum von Sap2 eingebaut und optimiert. Die Beschreibung für die Lage von Pepstatin A im aktiven Zentrum von Sap2 lieferte die Publikation von Cutfield et al. (27), allerdings ohne die wichtigen Röntgenkristallstrukturdaten.

2.6.2 Modell-Struktur von Sap2 mit Ritonavir und einem anderen peptidartigen Proteinaseinhibitor

Um ein Modell davon zu erstellen, wie die beiden Proteinaseinhibitoren Ritonavir und Inh18 (s. 2.1.4.2) im aktiven Zentrum von Sap2 liegen und welche Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum stattfinden, wurden die beiden Inhibitoren zunächst mit dem Programm FLEXX auf den Inhibitor A70450 gelegt, so dass sich eine möglichst große Übereinstimmung hinsichtlich der räumlichen Lage und der Ladungsverteilung im Molekül ergab. Zuvor musste mit dem Programm SYBYL 6.2 (Tripos Associates) noch eine Konformationsanalyse von Inh18 durchgeführt werden, um herauszufinden, welche räumliche Lage das Molekül aus energetischer Sicht überhaupt einnehmen kann. Die passendste räumliche Struktur des Proteinaseinhibitors wurde daraufhin in Sap2 eingebaut, und die Lage des Inhibitors mit SYBYL 6.2 optimiert.

Moleküle sind nicht starr, sondern bewegen sich ständig. Konformationsanalysen sagen nur aus, welche Formen ein Molekül einnehmen kann, sie sagen aber nichts über deren Bewegung aus. Proteine ändern ihre Konformation ständig. Diese Flexibilität ist wichtig für die Wechselwirkung mit dem Liganden. Diese Beweglichkeit kann man mit einer Moleküldynamiksimulation untersuchen.

Der optimierte Inhibitor im aktiven Zentrum wurde einer Moleküldynamik unterzogen, damit man feststellen konnte, ob er im aktiven Zentrum von Sap2 bleibt oder sich aufgrund von Abstoßungen aus dem aktiven Zentrum herausbewegt. Nachdem man so die wahrscheinlichste Struktur generiert hat, konnte man sich die vorhandenen Wasserstoff-Brückenbindungen (H-

Brückenbindungen) des Proteinaseinhibitors mit dem aktiven Zentrum von Sap2 berechnen lassen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ex vivo-Untersuchungen zur Bedeutung der Sap bei der vaginalen Kandidose

Erst einmal war es wichtig, ein *ex vivo*-Modell der vaginalen Kandidose auf der Basis eines rekonstituierten humanen Vaginalepithels (RHVE) mit einer Polycarbonatträgerschicht als Dermisersatz zu entwickeln, anhand dessen der Verlauf der Infektion mit *C. albicans* und der Einfluss der sekretorischen Aspartatproteinasen beobachtet werden kann. In diesem Modell konnte man die histologischen Veränderungen der Schleimhaut zu bestimmten Zeiten der Infektion direkt dem *SAP*-Genexpressionsmuster gegenüberstellen. Durch polyklonale, gegen Sap1-3 und Sap4-6 gerichtete, goldmarkierte Antikörper gelang der immunelektronenmikroskopische Nachweis der entsprechenden Antigene in den Hefezellen. Durch Zugabe von *SAP*-Nullmutanten konnte der direkte Einfluss der Sap auf den Verlauf einer vaginalen Kandidose untersucht werden und anhand des *SAP*-Genexpressionsmusters gezeigt werden, wie der Pilz versucht, diese Virulenzabschwächung zu kompensieren. Um zu kontrollieren, ob tatsächlich nur das gewünschte Gen ausgeschaltet wurde, setzte man die entsprechenden Revertanten ein, bei denen das deletierte Gen wieder eingesetzt worden war. Diese Revertanten sollten ein ähnliches histologisches Bild zeigen wie der Wildtyp. Die Enzyme Sap1 und Sap2 hat man auch direkt auf das RHVE gegeben, um zu kontrollieren, ob die Enzyme in der Abwesenheit von *C. albicans* einen Schaden anrichten können. Durch die Zugabe verschiedener Proteinaseinhibitoren konnte man deren Wirkung auf die Sap anhand des histologischen Bildes beobachten. Auch der Einfluss von *Lactobacillus acidophilus*, dem häufigsten Keim der normalen Scheidenflora, auf den Verlauf einer Infektion wurde untersucht. Um im Modell auch die Wirtsantwort zu simulieren, wurden PMN auf das RHVE gegeben und der Einfluss auf den Verlauf der Infektion untersucht.

3.1.1 Morphologie des nicht infizierten RHVE

Das RHVE besteht aus 6-8 Zellschichten mit einer Gesamtdicke von 64 µm ohne Stratum corneum (**Abb. 15**). Je nach Dauer der Inkubation mit PBS kommt es zu einer Dickenzunahme um 1-2 Keratinozytenschichten. Alle Zellen, auch die der obersten Zellschicht, enthalten Kerne. Die einzelnen Zellen zeigen elektronenmikroskopisch eindeutige Merkmale von Keratinozyten wie interzelluläre desmosomale Verbindungen und Tonofilamente. Die Basalzellschicht bildet gegenüber der Polycarbonatträgerschicht halbdesmosomenartige Strukturen aus.

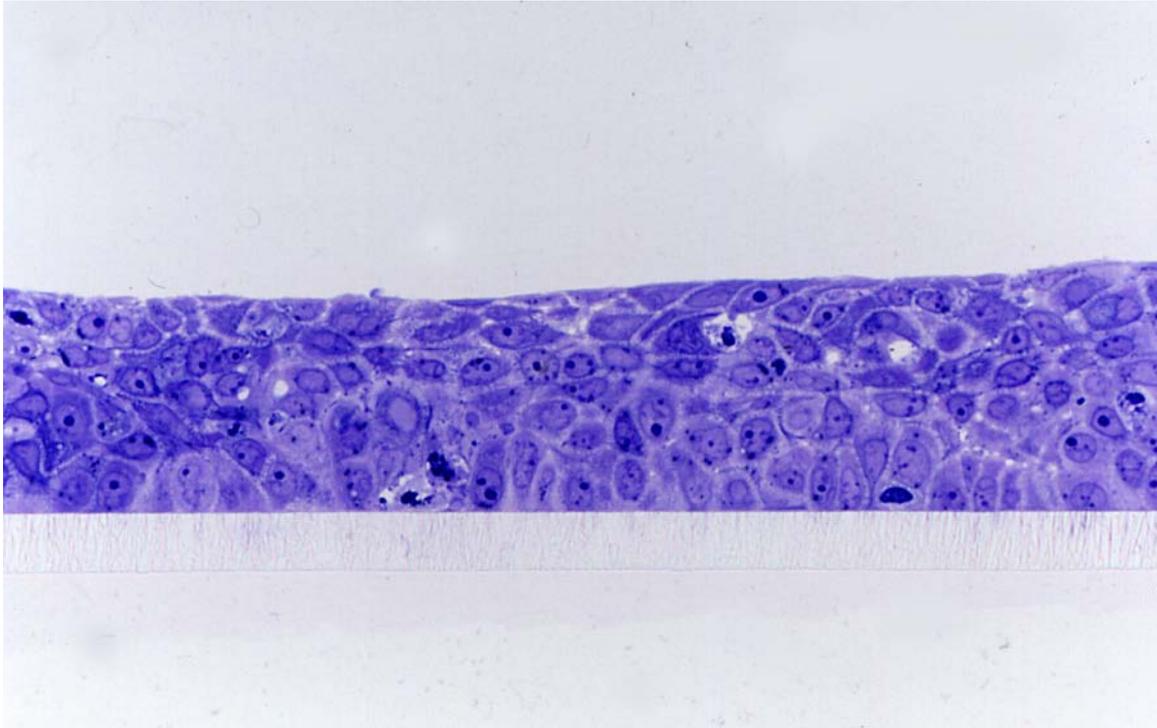


Abbildung 15. Nicht infiziertes rekonstituiertes Vaginaepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polycarbonatträgerschicht; x 400.

3.1.2 Morphologie des RHVE nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314

In den ersten 3h der Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 kam es zu keiner sichtbaren Schädigung des RHVE. Allerdings kam es schon nach 6-8 h zu einer leichten Schädigung des RHVE. Oberflächlich bildeten sich Ödeme und Vakuolen. Die Pilze lagerten sich an der obersten Zellschicht an, penetrierten aber noch nicht in das Gewebe (**Abb. 16**).

Nach 14h war das RHVE zur Hälfte zerstört. An der Oberfläche fanden sich nekrotische Keratinozyten. Es kam zu ödematösen Schwellungen der Keratinozyten, zahlreichen Vakuolen und zum Ablösen einzelner Zellen aus dem Zellverband, da die desmosomale Haftung der Keratinozyten untereinander verloren ging. Pilzzellen drangen in das RHVE ein (**Abb. 17**).

Bereits nach 24h drangen die Pilze tief in das Gewebe bis zur Basalzellschicht ein. Das Gewebe war fast vollständig zerstört (**Abb. 18**). In einer elektronenmikroskopischen Aufnahme nach 36h sieht man sehr deutlich, wie die Pilzzellen bis zur Polycarbonatträgerschicht durchgedrungen sind (**Abb. 19**).

Durch die Einstellung des Erhaltungsmediums und der PBS-Lösung auf pH 4,5 kam es nach einigen Stunden zur völligen Zerstörung der Haut auch ohne Infektion mit *C. albicans*.

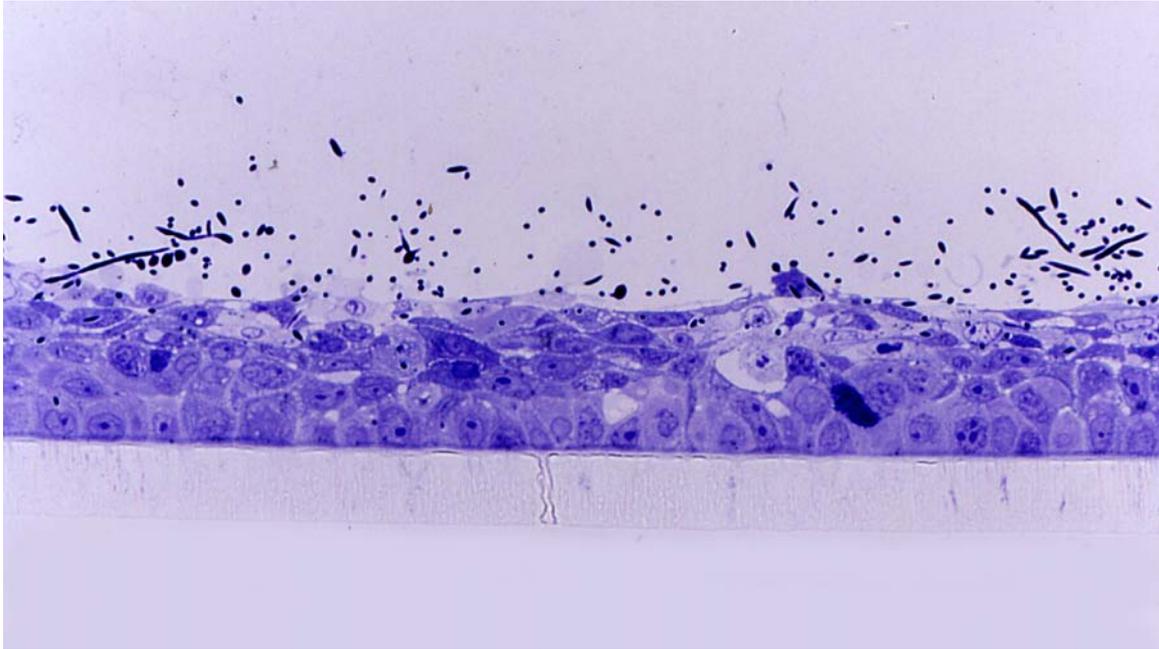


Abbildung 16. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 6h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Adhäsion der Hefezellen an die Schleimhautoberfläche mit kleineren oberflächlichen Vakuolen im Epithelverband; x 400.

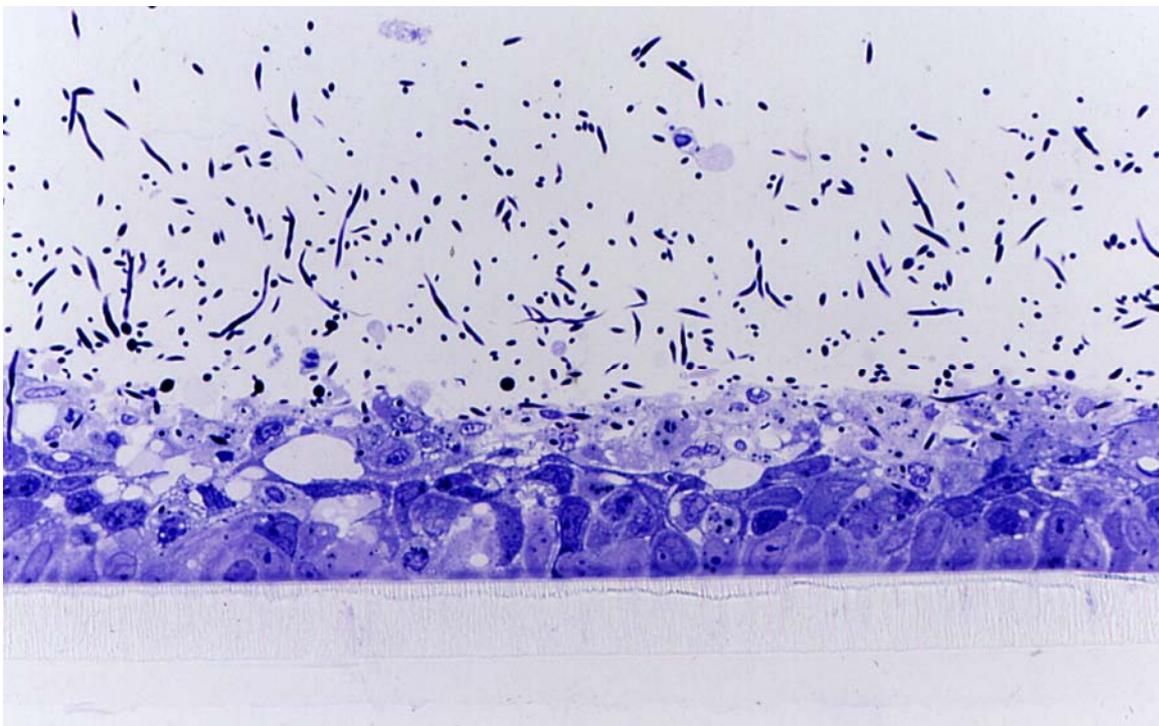


Abbildung 17. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 14h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Die Hefezellen haben die obere Hälfte des Epithels zerstört. Es kommt zur Bildung zahlreicher Vakuolen und von ödematös geschwollenen Keratinozyten. Einige Zellen lösen sich aus dem Epithel ab; x 400.

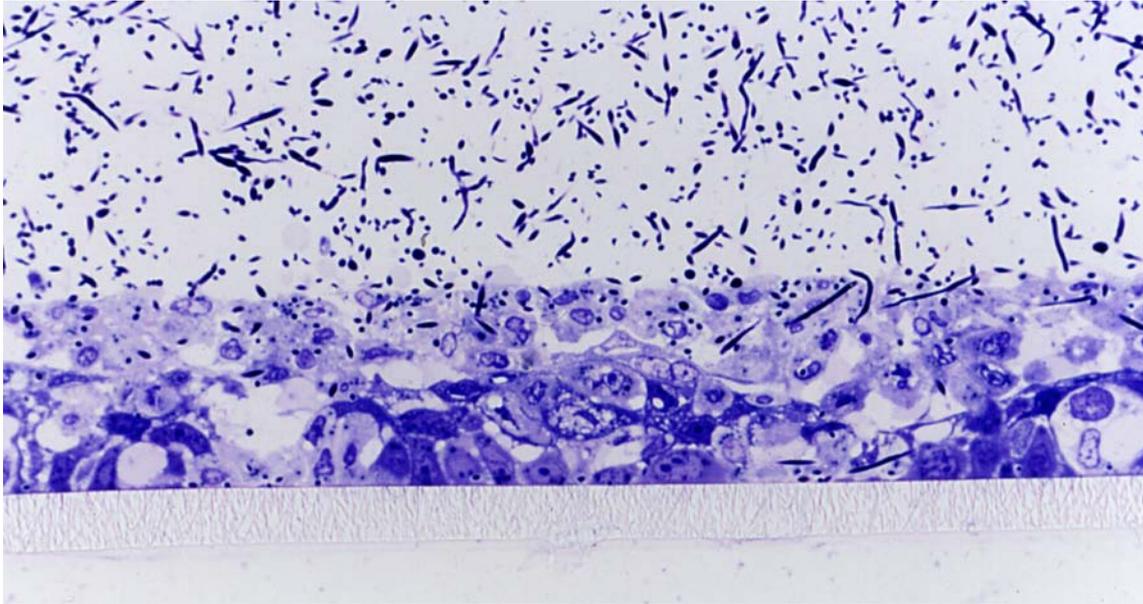


Abbildung 18. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Die Pilzzellen sind bis zur Basalzellschicht durchgedrungen. Das Epithel ist fast vollständig zerstört; x 400.

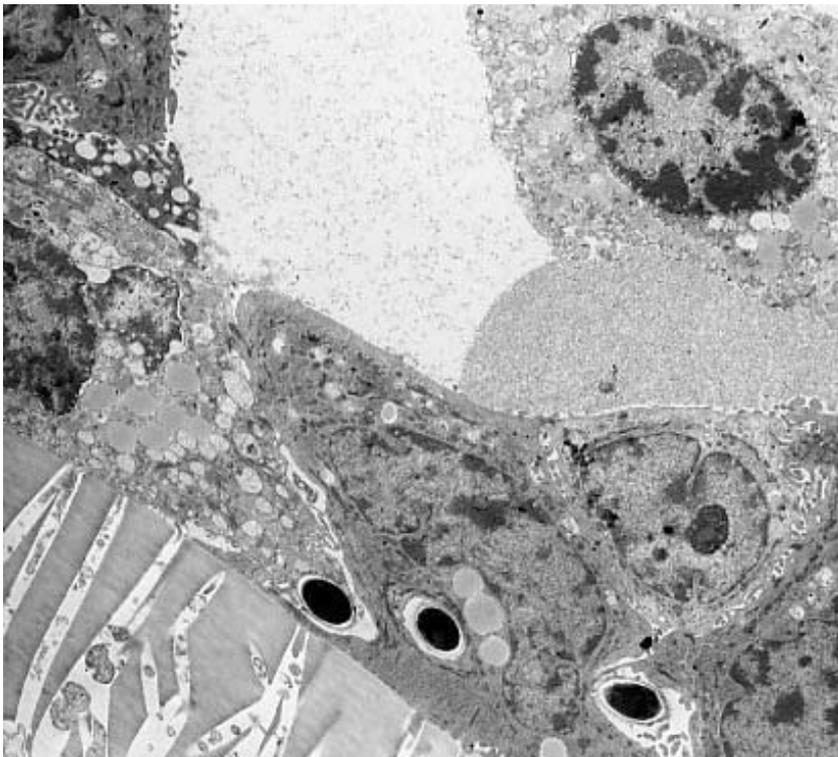


Abbildung 19. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel 36h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme sieht man, wie die Hefen bis zur Polycarbonatträgerschicht in das Vaginalepithel eingedrungen sind; x 33000.

3.1.3 *SAP*-Genexpression nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314

Im Verlauf der Infektion zeigte sich ein immer deutlicheres Schädigungsmuster des RHVE durch *C. albicans*. Parallel zu den histologisch beobachteten Schleimhautveränderungen wurde die *SAP*-Genexpression zu den entsprechenden Zeiten untersucht. Bereits nach 3-6h war eine *SAP*-Expression messbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde *SAP2*, *9* und *10* exprimiert (**Abb. 20**). Nach 14h kamen *SAP1*, *4* und *5* dazu (**Abb. 21**). Dieses war der Zeitpunkt, zu dem die Pilze begannen, in die Schleimhaut zu penetrieren. Nach 24h wurde *SAP1*, *2*, *4*, *5*, *6*, *9* und *10* exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Haut bereits stark geschädigt, und *C. albicans* war bereits bis zur Basalzellschicht vorgedrungen. Die Versuche wurden 3-5-mal wiederholt und es wurden immer die erwähnten Gene exprimiert. Zusätzlich kam es im späten Infektionsstadium, d.h. nach 24h bzw. 36h, in manchen Versuchen zur Expression von *SAP7* und *8*, aber nie zur Expression von *SAP3* (**Abb. 22**). Dies ist ein deutlicher Unterschied zu *ex vivo*- Modellen der oralen und kutanen Candidose (129, 130), wo jeweils *SAP3* eine wichtige Rolle spielt. Man konnte also deutlich eine zeitlich differentielle *SAP* Expression feststellen. *SAP9* und *10* scheinen konstitutiv exprimierte Gene zu sein, so dass man davon ausgehen kann, dass für den initialen Schritt der Adhäsion von *C. albicans* an die Vaginalschleimhaut *Sap2* von besonderer Bedeutung ist. Für die Invasion scheint dann vor allem *Sap1* und nur in geringem Maße *Sap4* und *5* wichtig zu sein. Interessanterweise wurden in der Versuchsreihe, bei der der pH-Wert des Erhaltungsmediums und der PBS Lösung auf pH 4,5 eingestellt war, nach 3 und 6h dieselben *SAP*-Gene exprimiert wie bei den sonst durchgeführten Versuchen bei neutralem pH-Wert. Der pH-Wert scheint daher für die Expression der *SAP*-Gene nicht von Bedeutung zu sein. Kontrollexperimente erfolgten mit spezifischen Primern zum Nachweis des konstitutiv exprimierten *EFBI*-Gens. Die Primer wurden so ausgewählt, dass das PCR-Amplifikationsprodukt das Gen-Intron mit einschloss (84). Aufgrund der Bandenhöhe des *EFBI*-Gens konnte bei Nachweis von *SAP*-Gen-spezifischen Banden der cDNA-Ursprung der Amplifikationsprodukte bewiesen werden. Außerdem konnte durch den Nachweis des konstitutiv exprimierten *EFBI*-Genproduktes gezeigt werden, dass eine negative *SAP*-Expression nicht auf einer Degradierung der vorhandenen mRNA beruht (**Abb. 23**).



Abbildung 20. *SAP*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR aus RNA 6h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314.

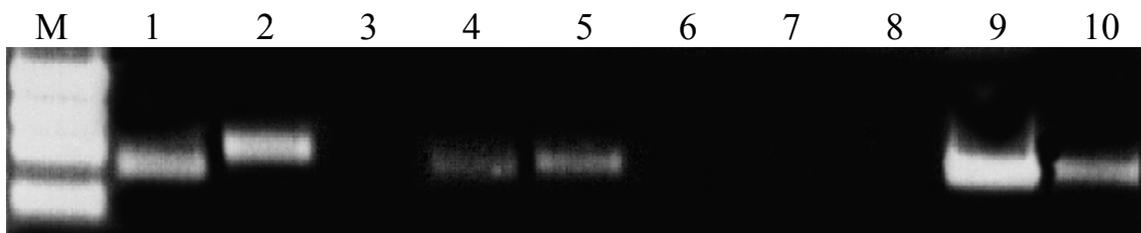


Abbildung 21. *SAP*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR aus RNA 14h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314.

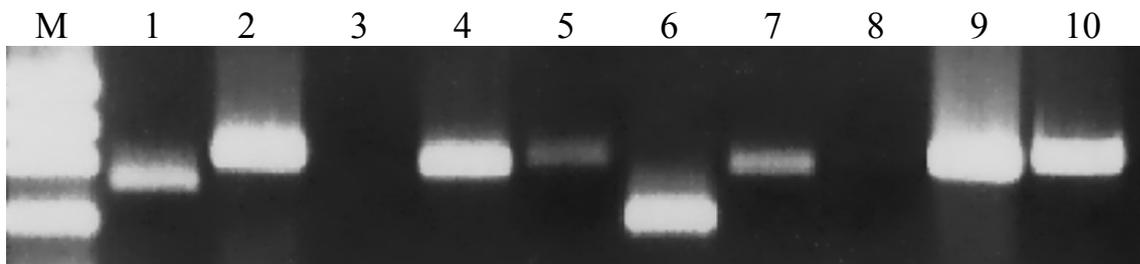


Abbildung 22. *SAP*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR aus RNA 24 h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314.

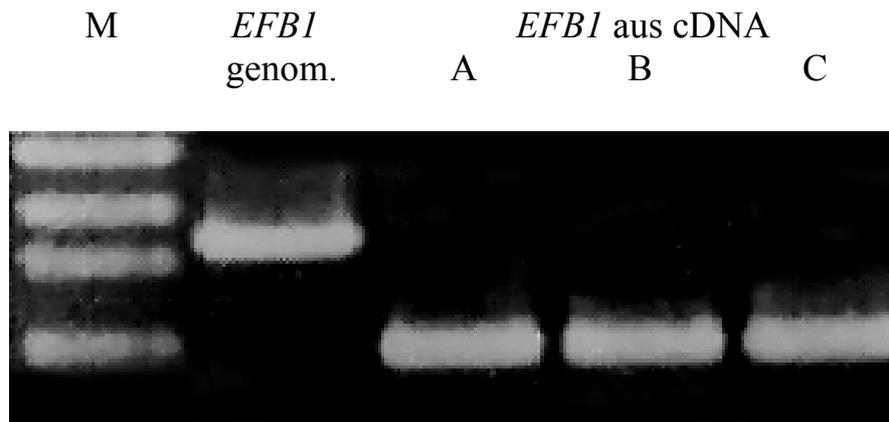


Abbildung 23. Der Nachweis des Elongationsfaktors *EFBI* dient als Kontrolle dafür, dass das *SAP*-Genexpressionsmuster aus cDNA und nicht aus genomischer DNA stammt.

3.1.4 Immunelektronenmikroskopischer Sap-Antigennachweis

Da die Läsionen im RHVE nach 12h mit einer starken Expression von *SAP1* und *SAP2* und einer schwächeren Expression von *SAP4-6* korrelierten, nahm man an, dass Sap1 und Sap2 eine besondere Bedeutung im frühen Stadium der Infektion zukommt. Um dies zu beweisen und um herauszufinden, wo die verschiedenen Sap-Enzyme im *ex vivo*-Modell der vaginalen Kandidose lokalisiert sind, verwendete man die beiden gegen Sap1-3 bzw. Sap4-6 gerichteten, polyklonalen Antikörper (12). Die mit Goldpartikeln konjugierten Antikörper wurden nach dem *Post-embedding*-Verfahren (96) auf die zuvor 12h mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierte *ex vivo*-Schleimhaut gegeben. Beim Einsatz der gegen Sap1-3 gerichteten Antikörper war eine deutliche Goldmarkierung innerhalb der Zellwand sichtbar (**Abb. 24**), wohingegen die Markierung mit gegen Sap4-6 gerichteten, polyklonalen Antikörpern deutlich geringer ausfiel (**Abb. 25**). Der Unterschied ist signifikant (**Tab. 3**). Kontrollexperimente ohne die Zugabe von Antikörpern zeigten 12h nach der Infektion mit dem Wildtyp SC5314 keine spezifische Goldmarkierung.

Stamm	Gegen Sap1-3 Goldpartikel		Gegen sap4-6 Goldpartikel	
	D	SA	D	SA
SC5314	75	53	26	17

Tabelle 3. Der Unterschied zwischen der anti-Sap1-3- und der anti-Sap4-6-Markierung ist signifikant ($p < 0,05$), bestimmt mit dem Fisher-Pitman-Test. Dabei ist D der Durchschnitt der Goldpartikelmenge, die in zehn zufällig ausgewählten Zellen gefunden wurde. SA entspricht der dazugehörigen Standardabweichung.

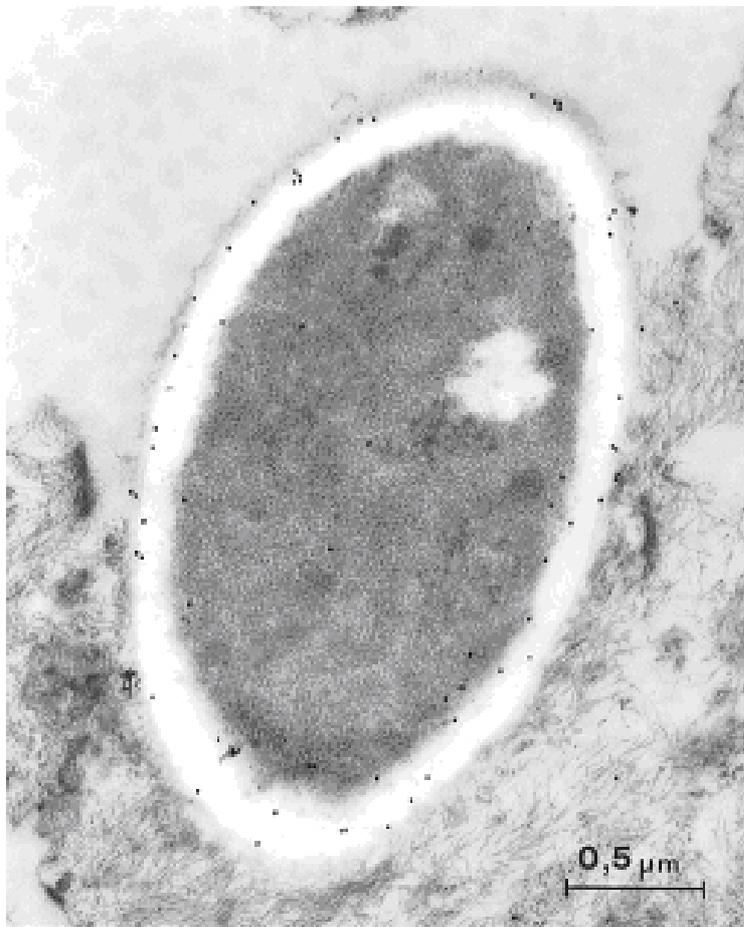


Abbildung 24. Postembedding-Immunogold-Markierung mit dem gegen Sap1-3 gerichteten, polyklonalen Antikörper, 12h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Es ist eine erhöhte Menge an Sap1-3- gegenüber Sap4-6-Antigen (s. Abb. 25) in der Zellwand zu finden. Strich = 0,5µm.

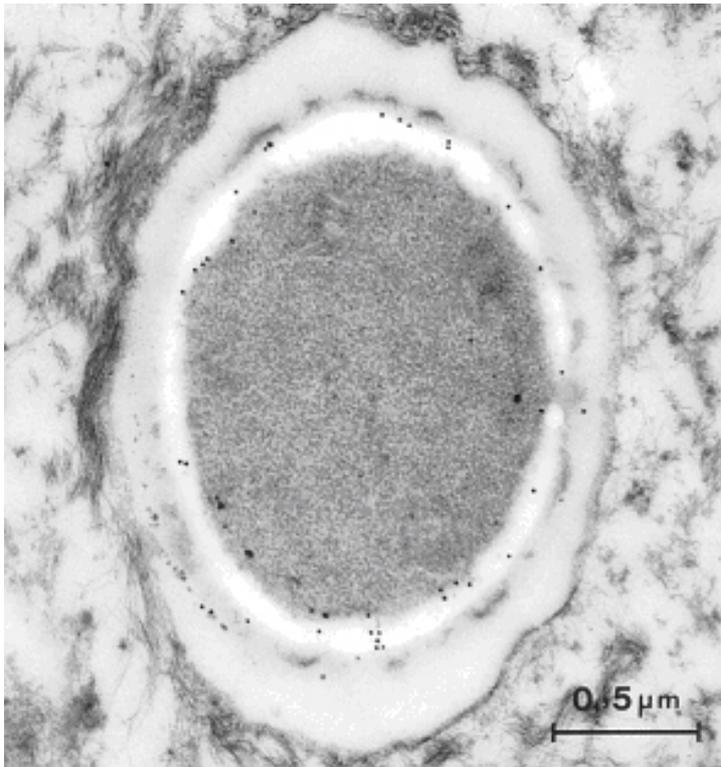


Abbildung 25. Postembedding-Immunogold-Markierung mit dem gegen Sap4-6 gerichteten, polyklonalen Antikörper, 12h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Strich = 0,5 μ m.

3.1.5 Morphologie des RHVE und *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und Proteinaseinhibitoren

Obwohl die Läsionen des RHVE immer zeitgleich mit einer bestimmten *SAP*-Expression auftraten, wäre es dennoch möglich gewesen, dass die sekretorischen Aspartatproteinasen nicht für den Schaden verantwortlich sind. Um dies auszuschließen, wurde das RHVE mit dem *C. albicans* Wildtyp und einem zusätzlichen Proteinaseinhibitor versetzt und die Schädigung des RHVE mit dem Schädigungsmuster bei alleiniger Wildtyp-Infektion verglichen.

12h nach Beginn der Wildtyp-Infektion ohne Zugabe von Pepstatin A war das bekannte Schädigungsbild mit Vakuolen und Ablösung einzelner Zellen aus dem Zellverband sichtbar. *C. albicans* war teilweise in die Schleimhaut eingedrungen (**Abb. 26**). Die Zugabe von Pepstatin A, einem klassischen unspezifischen Aspartatproteaseinhibitor, in einer Konzentration von 15 μ M bewirkte eine deutliche Abschwächung der Läsion. Die Adhäsion von *C. albicans* an das Gewebe wurde fast vollständig gehemmt. Bis auf einige wenige Zellen, die sich aus dem Gewebe abgelöst hatten, war das RHVE vollständig erhalten (**Abb. 27**). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch nach 6 bzw. 24h, wobei der Unterschied zur Wildtyp-Infektion ohne Pepstatin A nach 12h am deutlichsten war.

Da Pepstatin A nur eine Modells substanz ist, die *in vivo* nicht eingesetzt werden kann (121) wurden weitere Proteinaseinhibitoren auf ihre Wirksamkeit gegen Sap getestet. Die Wirkung der spezifischen HIV-Proteinaseinhibitoren Amprenavir und Ritonavir, die bei der Behandlung von AIDS im Zusammenhang mit der HAART (highly active antiretroviral treatment) in Kombination mit Reverse Transkriptase Inhibitoren verabreicht werden, auf den Verlauf der *C. albicans*-Infektion wurde untersucht. Die verwendeten Konzentrationen an Amprenavir (0,5 µM) und Ritonavir (32 µM) entsprachen den Konzentrationen, die bei oraler Gabe auch bei HIV-Patienten erreicht werden (56, 59). Die Infektion des RHVE mit *C. albicans* und Ritonavir für 12h zeigte eine deutliche Abschwächung der Läsion im Vergleich zur Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp ohne Ritonavir (**Abb. 28/29**). Bei der Wildtyp-Infektion ohne Ritonavir war das Epithel bis auf die Basalzellreihe zerstört. Es kam zu zahlreichen Vakuolen, und der Pilz drang in das Gewebe ein. Bei der Infektion mit *C. albicans* und Ritonavir war hingegen nur die obere Hälfte des Epithels geschädigt. Es gelang dem Pilz nicht, in die Schleimhaut einzudringen. Nach 6 bzw. 24h war der Schadensunterschied vergleichbar mit dem 12h-Bild. Auch Ritonavir scheint damit einen schützenden Effekt auf die Pilzinfektion durch Hemmung der Sap zu haben, allerdings ist der Schutz deutlich geringer als bei der Zugabe von Pepstatin A. Dies kann daran liegen, dass Ritonavir speziell gegen HIV-Proteinasen entwickelt wurde und somit die Spezifität für bestimmte Sap sehr gering ist. Dies stimmt auch mit einer Veröffentlichung von Pichova et al. überein, bei der gezeigt werden konnte, dass die inhibitorische Konzentration von Ritonavir gegenüber Sap im Vergleich zu Pepstatin A um den Faktor 200 höher ist, d.h. Ritonavir hemmt Sap wesentlich schlechter als Pepstatin A (108). Die Zugabe von Amprenavir zu *C. albicans* bewirkte nach 24h Infektion keine deutliche Verringerung des Schadensbildes, was darauf schließen lässt, dass Amprenavir sehr spezifisch HIV-Proteinasen hemmt und kaum in der Lage ist, Sap zu hemmen.

Auch die Zugabe eines peptidartigen Inhibitors (Inh18; s. 2.1.4.2), der von Pichova et al. speziell gegen Sap der verschiedenen *Candida* Spezies entwickelt wurde (108), zu *C. albicans* bewirkte einen deutlichen Rückgang der Läsionen im RHVE. Die Hefen drangen nicht mehr so massiv in die Schleimhaut ein.

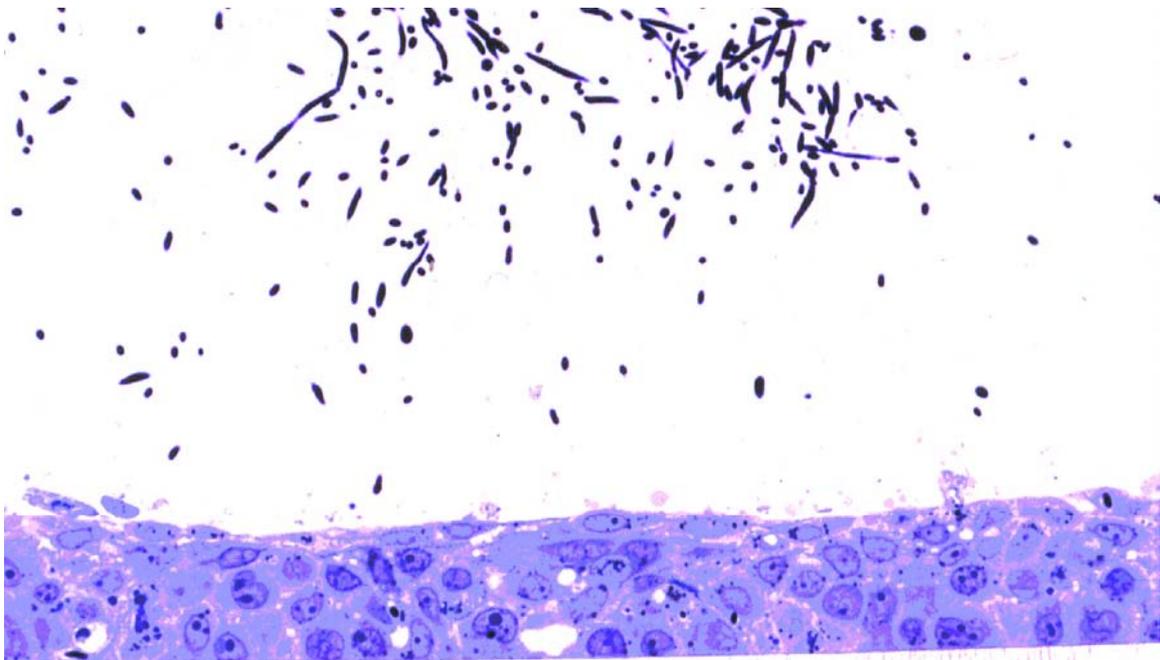
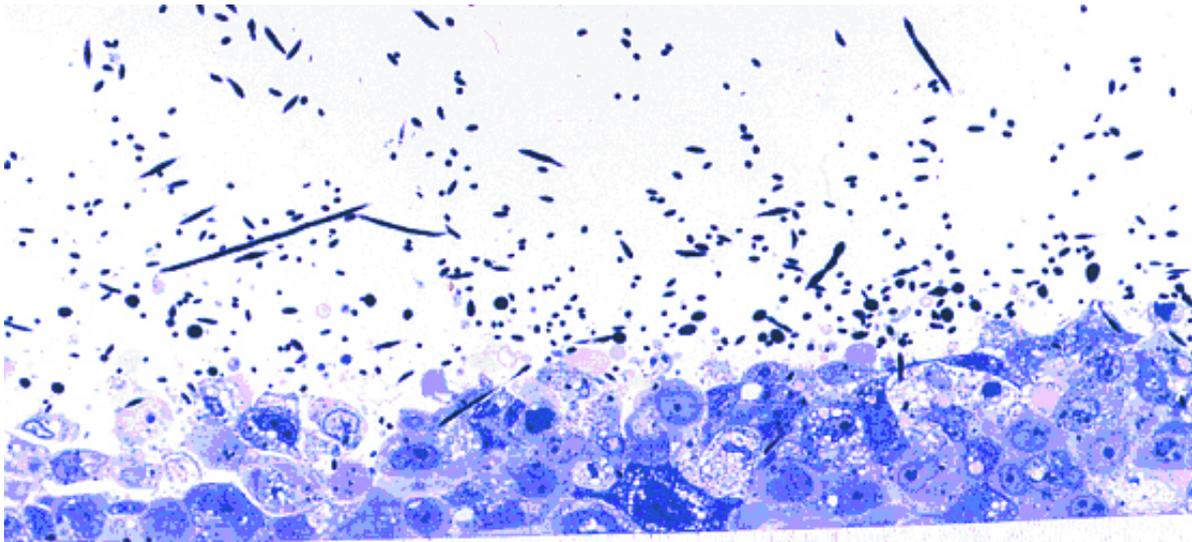


Abbildung 26/27. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 für 12h (Abb. 26) und zusätzlich Pepstatin A (Abb. 27). Durch die Zugabe von Pepstatin A kommt es zu einem deutlich reduzierten Schädigungsmuster. *C. albicans* ist nicht mehr invasiv, und das Epithel ist fast vollständig intakt; x 400.

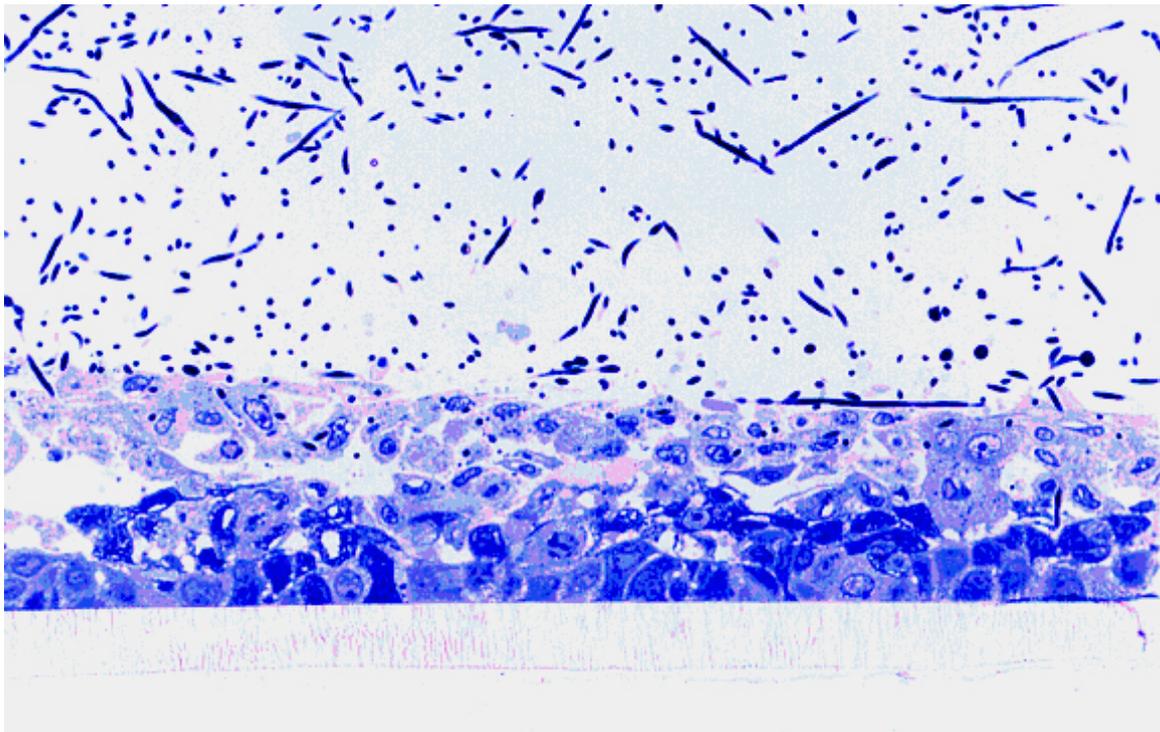
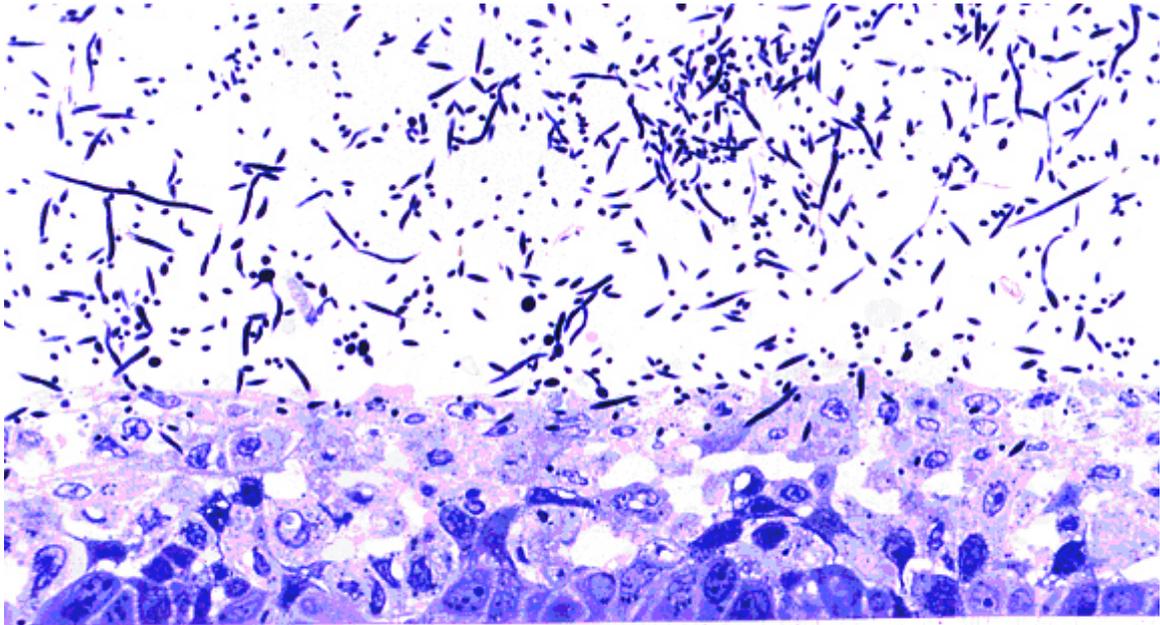


Abbildung 28/29. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 (Abb. 28) und zusätzlich mit Ritonavir, einem HIV-Proteinaseinhibitor (Abb. 29) für 24h. Durch die Zugabe von Ritonavir kommt es zu einer geringeren Schädigung des Epithels. Außerdem dringen kaum noch Pilze in die Schleimhaut ein; x 400.

Diese Resultate, v.a. mit Pepstatin A, Inh18 und auch Ritonavir, sind ein Indiz für die besondere Rolle der Sap von *C. albicans* als Virulenzfaktoren bei der vaginalen Kandidose. Außerdem bieten sie einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Antimykotika, was vor allem im Hinblick auf die mittlerweile weit verbreiteten Resistenzen gegen herkömmliche Antimykotika besonders wichtig ist (2, 3, 127, 128).

Die normale *SAP*-Expression nach 24h im Vaginalmodell ist *SAP1*, 2, 4, 5, 6, 9 und 10. Bei dem Infektionsmodell mit Ritonavir wird dagegen nur *SAP1* und 2 exprimiert (**Abb. 30**). Die Ursache dafür ist bis jetzt nicht geklärt.



Abbildung 30. *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 und Ritonavir für 24h.

3.1.6 Morphologie des RHVE nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und *Lactobacillus acidophilus*

Im RHVE wurde auch die Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* auf den Verlauf einer *C. albicans*-Infektion untersucht. Hierzu wurde die Schleimhaut mehrmals 6 und 12h mit *C. albicans* und zusätzlich 1×10^7 *Lactobacillus acidophilus*-Zellen versetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Lactobazillen einen deutlichen Schutz vor *Candida*-Infektionen bieten. Die Pilze waren nicht mehr in der Lage, sich an das RHVE anzuhafte. Im histologischen Bild waren nach 6h keine Pilzzellen mehr nachweisbar, da alle Zellen bei der Fixierung in Folge der fehlenden Adhärenz vom RHVE gespült wurden (**Abb. 31**). Diese Ergebnisse stimmen auch mit Untersuchungen von Osset et al. überein, die ergeben haben, dass Lactobazillen vor einer vaginalen Infektion mit *C. albicans* *in vitro* schützen (104, 105).

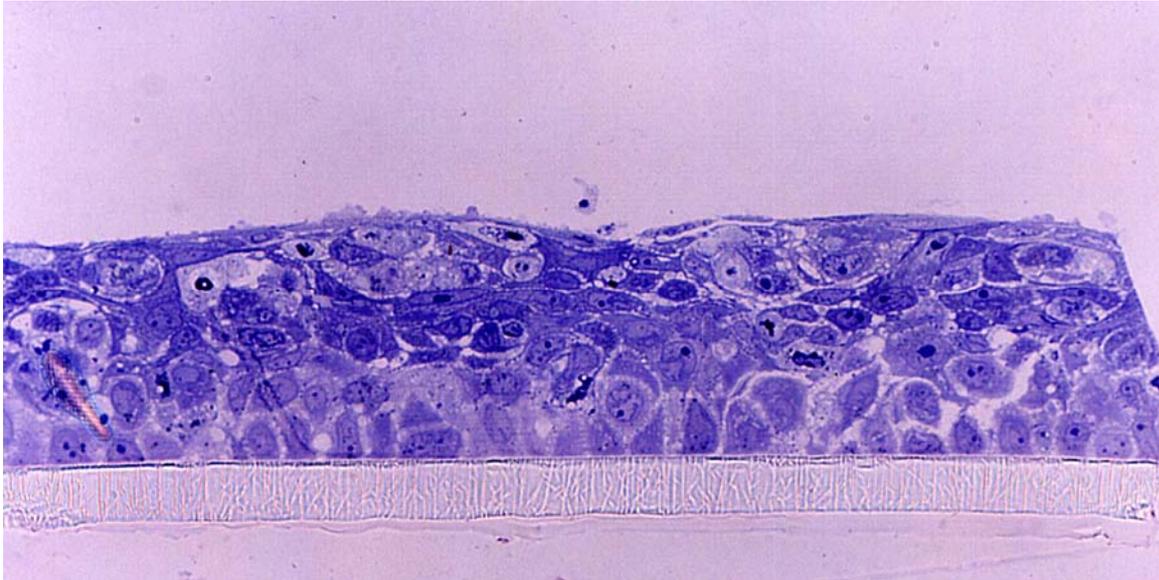


Abbildung 31. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp und *Lactobacillus acidophilus* für 12h. Durch die fehlende Adhärenz der Hefezellen an die Vaginalschleimhaut aufgrund der Zugabe von Lactobazillen werden sämtliche *Candida*-Zellen bei der Fixierung von der Schleimhaut gespült. Das Gewebe bleibt vollständig intakt; x 400.

3.1.7 Morphologie des RHVE nach Infektion mit der $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - und $\Delta sap4-6$ -Mutante

Nachdem vorher sowohl gezeigt werden konnte, welche Isoenzyme in welchem Stadium der Infektion exprimiert werden, als auch die Bedeutung der Sap für die Entstehung einer vaginalen Kandidose sowie deren Hemmung durch Proteinaseinhibitoren dargestellt wurde, sollte nun mit Hilfe der $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - und $\Delta sap4-6$ -Mutante die Bedeutung dieser Isoenzyme für die Ausprägung der Läsion näher charakterisiert werden. Das RHVE wurde dazu mit den durch *gene-targeting* (45, 53) erzeugten *SAP*-Nullmutanten für 6, 12 und 24h infiziert. Es zeigte sich bei beiden Einfachmutanten eine deutliche Abschwächung der Virulenz verglichen mit dem Wildtyp. Während die Infektion mit SC5314 bereits nach 12h zu einer Läsion führte, die fast das gesamte Epithel betraf (**Abb. 32**), war jeweils nach 12h Infektion mit den Einfachmutanten $\Delta sap1$ (**Abb. 33**) und $\Delta sap2$ nur die obersten 2-3 Zellschichten betroffen. Nach 6h Infektion mit der $\Delta sap2$ -Mutante zeigte sich noch keinerlei Schaden (**Abb. 34**) an dem RHVE. Die geringere Virulenz verdeutlicht sich auch, wenn man das invasive Verhalten der beiden Stämme betrachtet. So war im Vergleich zum Wildtyp die Sap1-defiziente Mutante in ihrer Invasivität auf 50% reduziert. Die Invasivität der $\Delta sap2$ -Mutante ging sogar um fast 80% zurück. Man konnte damit zeigen, dass sowohl Sap1 als auch Sap2 eine herausragende Bedeutung bei der vaginalen Kandidose besitzen.

Anders sieht es dabei mit der $\Delta sap4-6$ -Mutante aus. Diese Mutante ist nicht in der Lage, die Schleimhautschädigung zu verringern. Im Gegenteil, es scheint durch die $\Delta sap4-6$ -Mutante sogar zu einer größeren Schädigung des RHVE verglichen mit der Wildtypinfektion zu kommen (**Abb. 35/36**).

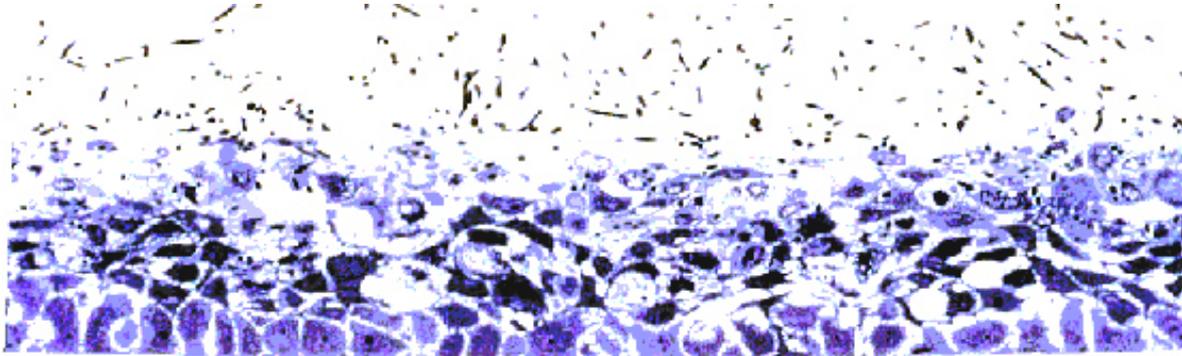


Abbildung 32. Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 für 12h. Fast alle Zellschichten sind geschädigt. Es bilden sich zahlreiche Vakuolen, und die Keratinozyten sind ödematös geschwollen; x 400.

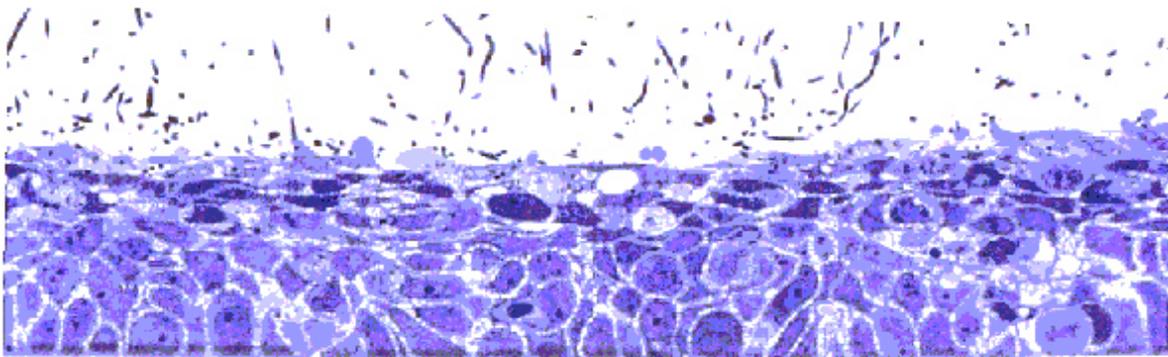


Abbildung 33. Infektion mit der $\Delta sap1$ -Mutante für 12h. Das Schädigungsmuster ist deutlich geringer ausgeprägt als bei der Wildtypinfektion; x 400.

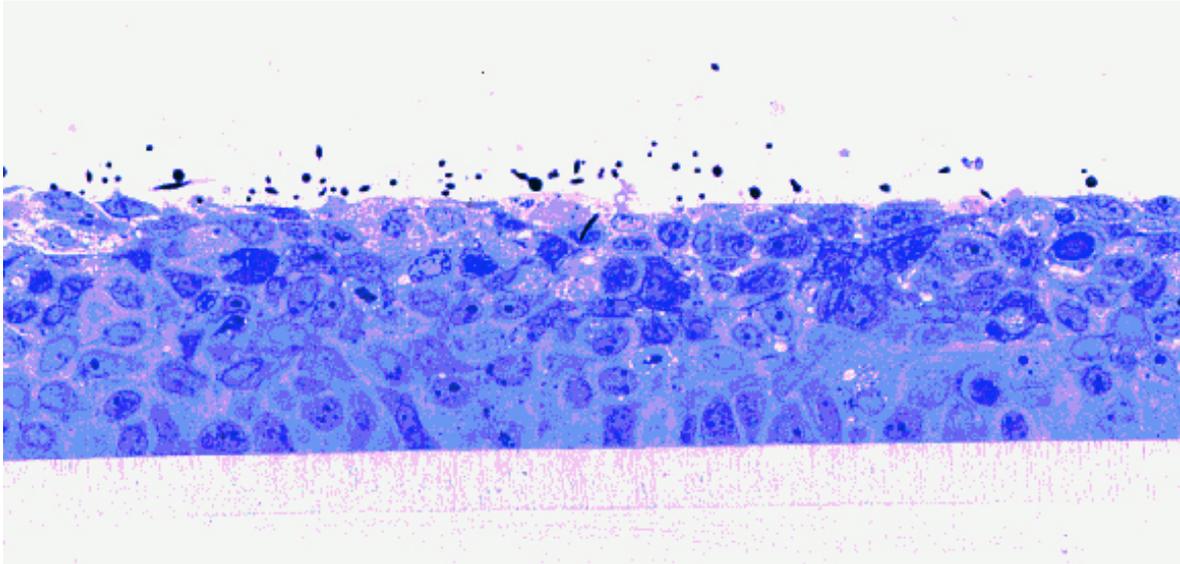


Abbildung 34. Infektion des RHVE mit der *Δsap2*-Mutante für 6h. Die *Candida albicans*-Zellen sind kaum in der Lage, in die Vaginalschleimhaut einzudringen. Das Epithel ist vollständig erhalten; x 400.

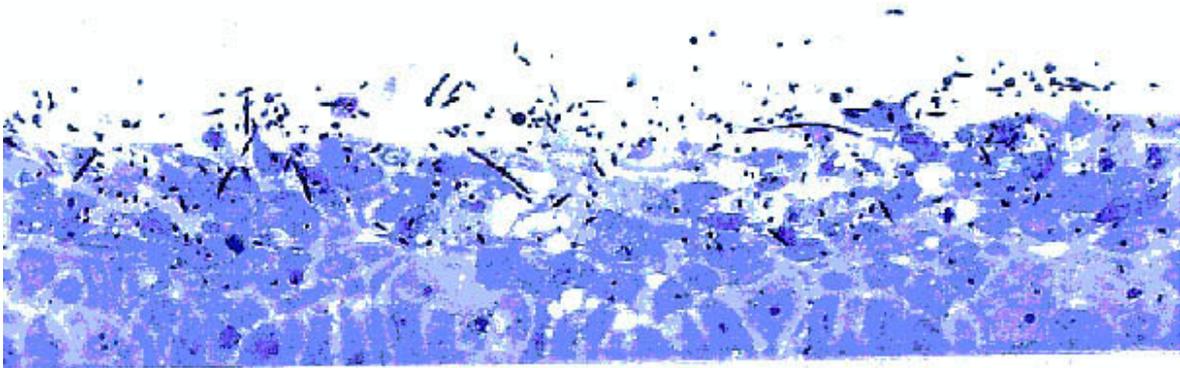


Abbildung 35. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Die Pilzzellen sind etwa bis zur Mitte in das Epithel eingedrungen. Es bilden sich zahlreiche Vakuolen; x 400.

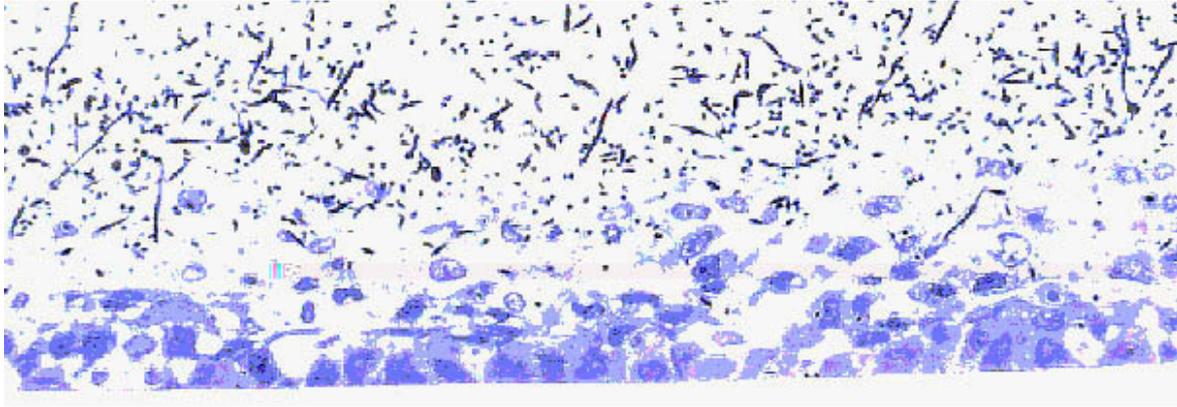


Abbildung 36. Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit der $\Delta sap4-6$ -Mutante. Das Epithel ist bis auf die Basalzellschicht geschädigt; x 400.

3.1.8 *SAP*-Genexpression nach Infektion mit der $\Delta sap1$ - und $\Delta sap2$ -Mutante

Im Vergleich zur Wildtypinfektion, bei der nach 12h *SAP1*, 2, 4, 5, 9 und 10 exprimiert wurden, zeigte sich bei der Infektion mit der $\Delta sap1$ -Mutante nach 12h eine kompensatorische Hochregulierung von *SAP8*. Es wurde also *SAP2*, 5 und *SAP8-10* exprimiert (**Abb. 37**) Diese Hochregulierung konnte in mehreren Versuchen bestätigt werden. Bei der $\Delta sap2$ -Mutante wurde kompensatorisch kein anderes Gen hochreguliert.

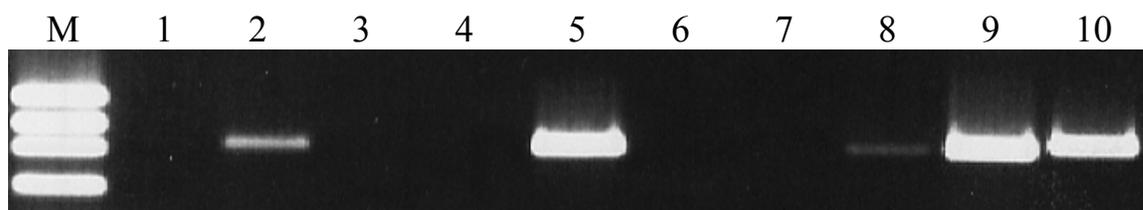


Abbildung 37. *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit der $\Delta sap1$ -Mutante für 12h.

3.1.9 Morphologie des RHVE nach Infektion mit der *Δsap1*- und *Δsap2*-Revertante

Der Einsatz der entsprechenden Revertanten dient dazu, nachzuweisen, dass die entsprechende Virulenzabschwächung der Mutanten auch tatsächlich auf das deletierte Gen zurückzuführen ist, welches man ausschalten wollte, und nicht auf irgendwelche anderen Mutationen, die nicht beabsichtigt waren. Hierzu wird der *Δsap1*- und *Δsap2*-Mutante das fehlende Gen *SAP1* bzw. *SAP2* mit Hilfe eines Plasmids wieder eingesetzt. Das Schädigungsmuster der Revertanten soll dem des Wildtyps möglichst ähnlich sein. Dies konnte beim RHVE histologisch gezeigt werden (**Abb. 38-41**).

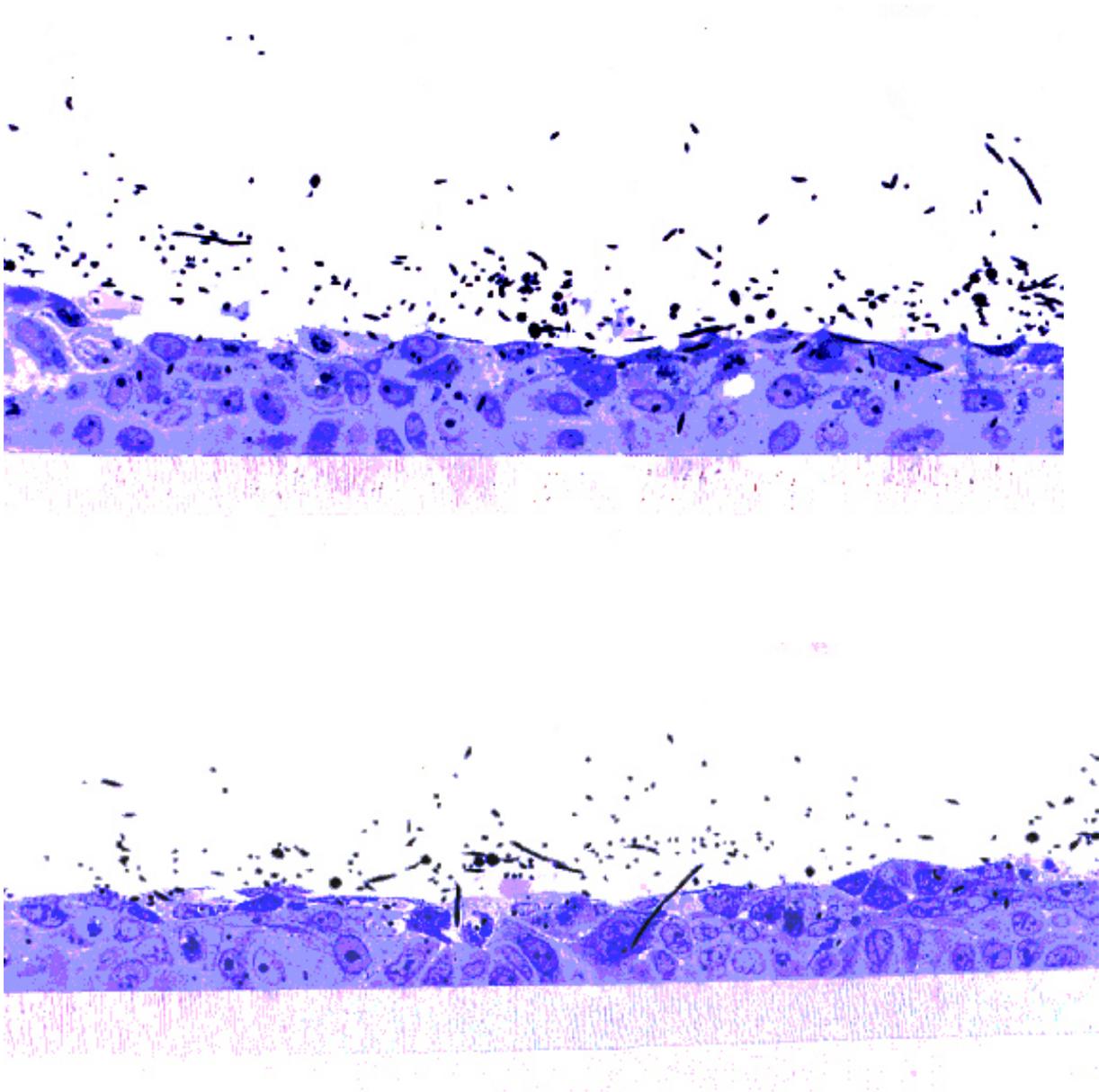


Abbildung 38/39. Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 (Abb. 38) und der *sap2*-Revertante (Abb. 39) für 6h. Das Schädigungsmuster der Revertante ist der Wildtypinfektion sehr ähnlich; x 400.

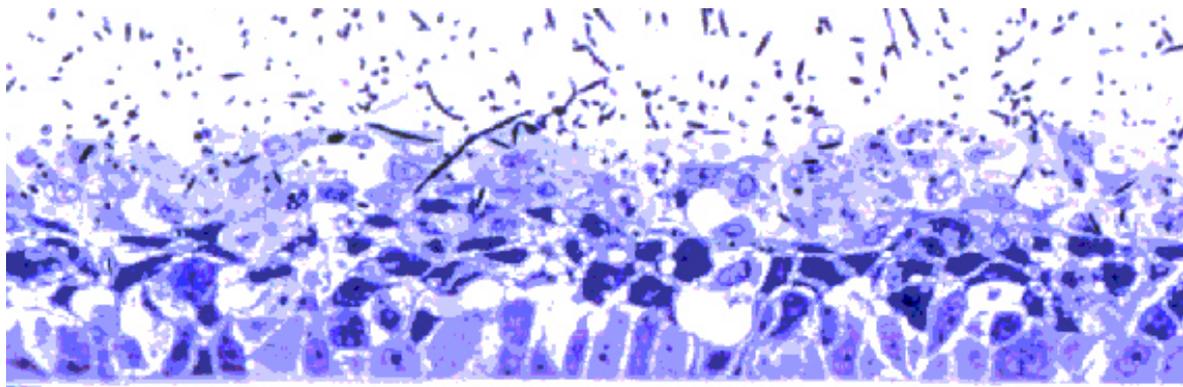
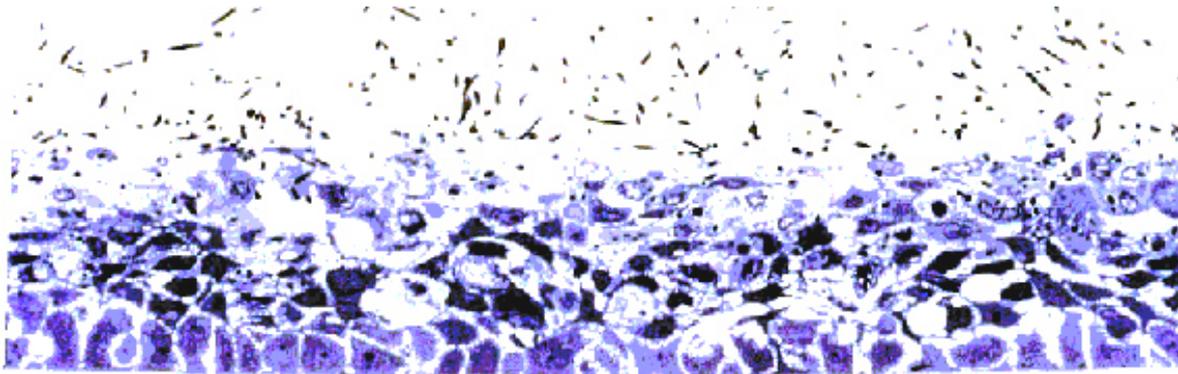


Abbildung 40/41. Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 (Abb. 40) und der *sap1*-Revertante (Abb. 41) für 12h. Das Schädigungsmuster der Revertante ist der Wildtypinfektion sehr ähnlich; x 400.

3.1.10 Morphologie des RHVE nach Exposition gegenüber den Enzymen Sap1 und Sap2

Um herauszufinden, ob die Enzyme Sap1 und Sap2 ohne ihren Wirt *C. albicans* in der Lage sind, das RHVE zu schädigen, infizierte man das RHVE mit den rekombinanten Enzymen. Tatsächlich führte die Zugabe von Sap1 nach 6h zu einer deutlichen Läsion des Epithels mit Ödemen und Vakuolen (**Abb. 42**). Die Zugabe des Sap2-Enzyms führte hingegen nur zu geringen interzellulären Ödemen (**Abb. 43**).

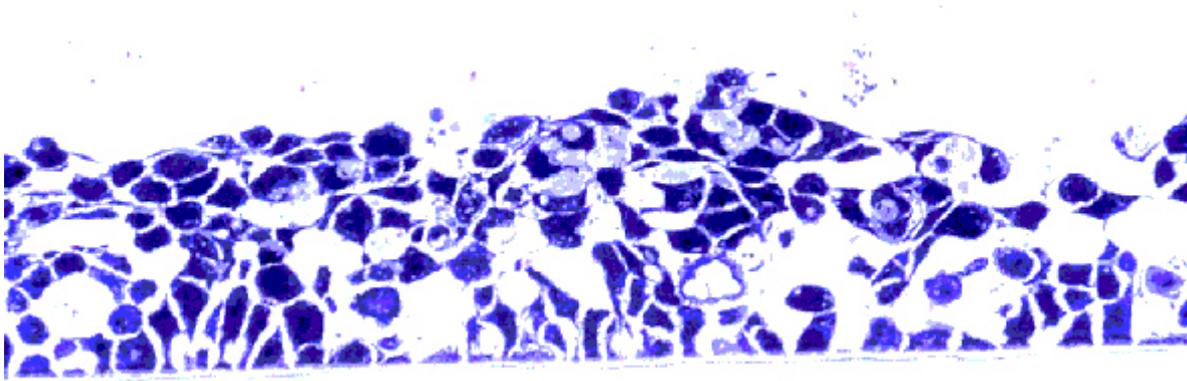


Abbildung 42. Infektion des RHVE mit dem Sap1-Enzym für 6h führt zu einer deutlichen Schädigung des Epithelverbands mit zahlreichen Vakuolen; x 400.

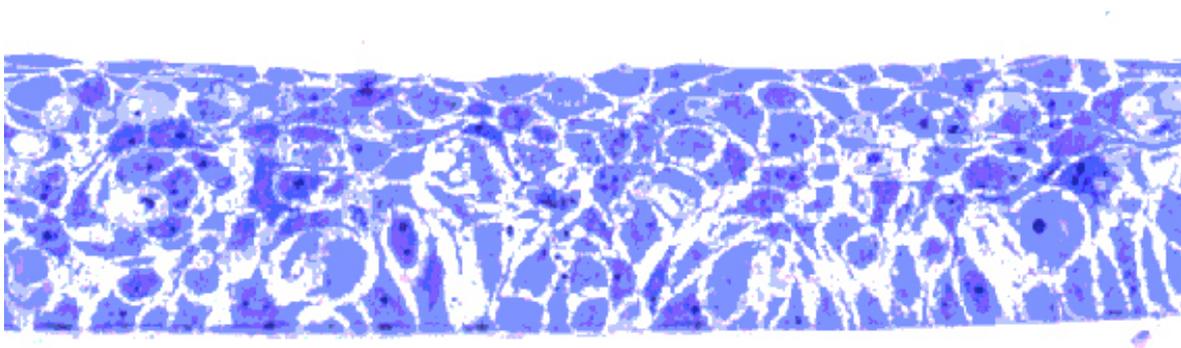


Abbildung 43. Exposition des RHVE gegenüber dem Sap2-Enzym für 6h führt zu geringen interzellulären Ödemen. Die Schädigung des Epithels fällt im Vergleich zur Infektion mit dem Sap1-Enzym deutlich geringer aus; x 400.

3.1.11 Morphologie des RHVE nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und PMN

PMN kommen normalerweise zusammen mit Makrophagen und anderen Immunzellen in der menschlichen Vagina vor (106). Bei der vaginalen Candidose kommt es *in vitro* bei der Maus zu einem Einstrom von PMN in die Vagina (9). Bei der Ratte kommt es hingegen nur zu einer minimalen Infiltration entzündlicher Zellen (21). Welche Rolle die PMN bei der vaginalen Candidose des Menschen spielen, sollte nun anhand des *ex vivo*-Modells der vaginalen Candidose geklärt werden. Hierzu wurde das RHVE nach 7 bzw. 19h Infektion mit *C. albicans* für 5h mit 4×10^6 PMN versetzt. Ohne PMN führte die Infektion des Epithels mit SC5314 zur Invasion und zur bekannten Läsion. Nach 24h sind bis auf die Basalzellreihe alle übrigen Zellschichten geschädigt (**Abb. 44**). Unter dem Einfluss der Neutrophilen war das Schadensbild reduziert. *C. albicans* ist

nicht mehr invasiv, und im Gegensatz zur Wildtyp-Infektion ohne PMN sind die unteren 2-3 Epithelzellschichten intakt (**Abb. 45**).

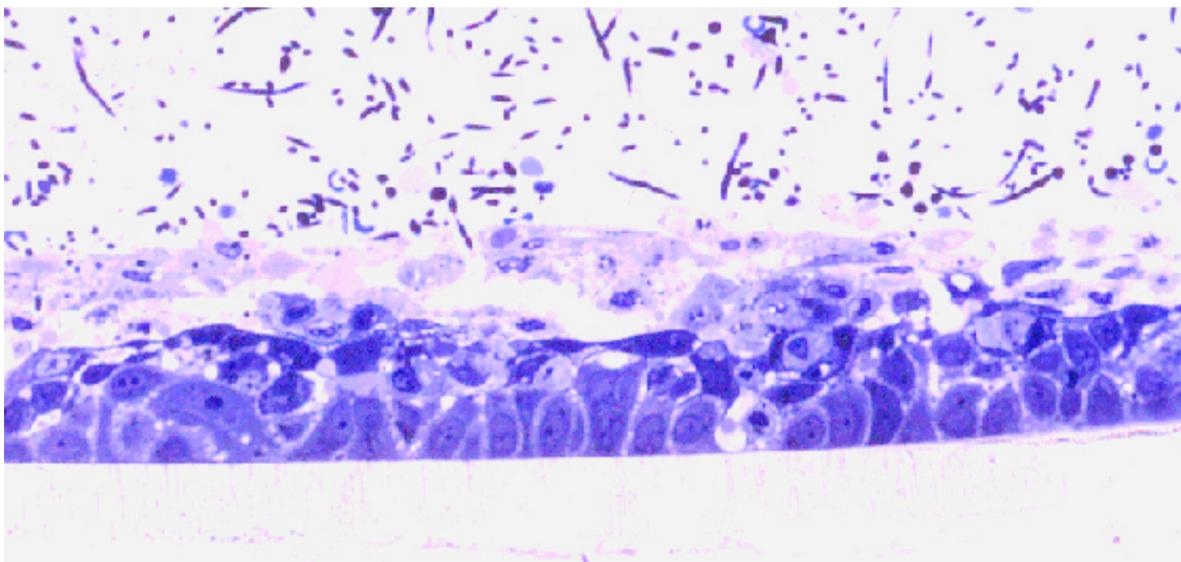
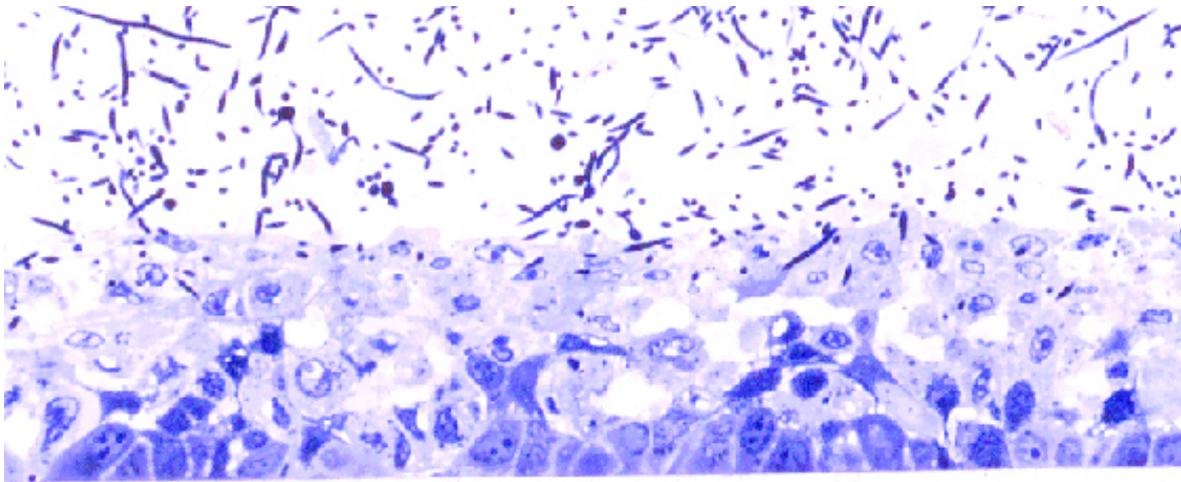


Abbildung 44/45. Die Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 führt nach 24h zum bekannten Schädigungsbild. Bis auf die Basalzellschicht sind alle Zellschichten geschädigt (Abb. 44). Durch die Zugabe von PMN zum Infektionsmodell nach 19h für 5h ist das Schädigungsbild deutlich reduziert. Die untersten 2-3 Zellschichten sind intakt (Abb. 45); x 400.

3.1.12 *SAP*-Genexpression nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und PMN

In Gegenwart von PMN war die Zahl der exprimierten *SAP*-Gene immer vermindert. Meistens wurde nur *SAP1* exprimiert (**Abb.46**). Warum das so ist, ist bis jetzt unklar. Möglicherweise wird durch die PMN selbst oder durch die in deren Anwesenheit exprimierten Zytokine eine Signalkaskade ausgelöst, die im Inneren der Pilzzelle die Expression bestimmter *SAP*-Gene inhibiert.



Abbildung 46. *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 und PMN. Nach 24h Infektion wird nur *SAP1* exprimiert. Die PMN wurden nach 19h dazugegeben.

3.2 LDH-Test

Um eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Läsion im RHVE zu erhalten und um die unterschiedlichen Schädigungsmuster besser vergleichen zu können, wurde die LDH-Konzentration, als Maß für die Schädigung der Zellen, gemessen (**Tab. 4**).

Die LDH-Konzentration der nicht infizierten Schleimhaut, bei der das Gewebe voll intakt ist, liegt immer bei Werten zwischen 25 und 35 U/l. Die LDH-Konzentration bei der *Δsap1*-Revertante ist immer vergleichbar mit der Konzentration bei Einsatz des Wildtyps, d.h. es wurde tatsächlich nur das *SAP1* Gen in der Mutante ausgeschaltet und in der entsprechenden Revertante erfolgreich wieder eingeführt. Die LDH-Konzentration bei der *Δsap1*-Mutante liegt immer deutlich unter der Konzentration, die beim entsprechenden Wildtyp gemessen wurde. Das bedeutet, dass, wie bereits histologisch beobachtet, die Schädigung des RHVE durch die Mutante wesentlich geringer ist als durch den Wildtyp. Erst zu sehr späten Zeitpunkten gleicht sich die LDH-Konzentration, die bei der *Δsap1*-Mutante gemessen wurde, der beim Wildtyp gemessenen Konzentration an, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass zu diesem späten Zeitpunkt sowohl die Zellen des Wildtyps als auch der Mutante völlig zerstört sind. Die LDH-Konzentrationen der *Δsap2*-Mutante, gemessen nach 6 und 12h, lagen auch deutlich unter denen des Wildtyps. Die Werte des

zusätzlich mit *Lactobacillus acidophilus* infizierten Epithels lagen mit 38 U/l nach 12h auch nur knapp über dem Wert des nicht infizierten RHVE. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass Lactobazillen vor einer *Candida*-Infektion im vaginalbereich schützen.

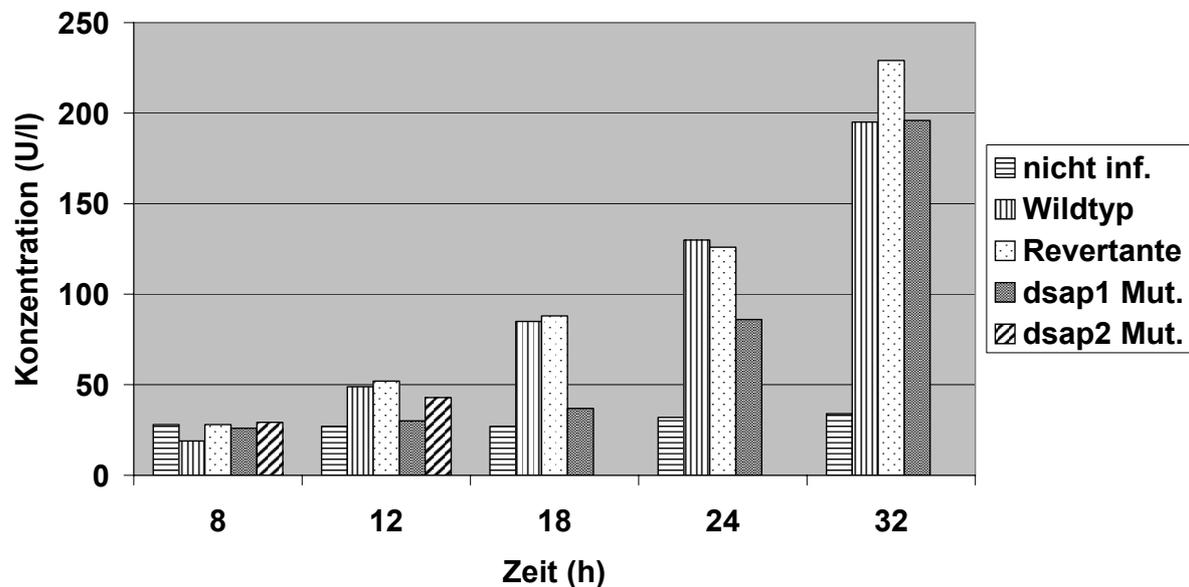


Tabelle 4. LDH-Konzentration der unterschiedlichen Stämme in Abhängigkeit von der Zeit.

3.3 Zytokinexpression nach Infektion mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314

Zytokine sind wichtig für die Reaktion des Wirtes auf eine Infektion. Interleukin-8 spielt eine bedeutende Rolle für die Anlockung von PMN. IL-8 seinerseits wird durch die Expression von TNF- α und IL-1 α induziert. Zytokine können von verschiedenen Immunzellen, aber auch von Keratinozyten exprimiert werden. Sollten, wie bereits vermutet, PMN bei der vaginalen Candidose eine Rolle spielen, so müsste IL-8 exprimiert werden. Tatsächlich konnte man diese IL-8 Expression im RHVE sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen. Man verwendete das Erhaltungsmedium des nicht infizierten bzw. des mit *C. albicans* infizierten RHVE. Nach 1, 3, und 6h zeigte sich beim nicht infizierten RHVE keine Expression von IL-8 auf mRNA-Ebene (**Abb. 47**). Bei dem infizierten RHVE konnte eine deutliche Expression von IL-8 nach 1, 3 und 6h nachgewiesen werden, wobei die Expression nach 1 und 3h stärker war als nach 6h (**Abb. 48**).

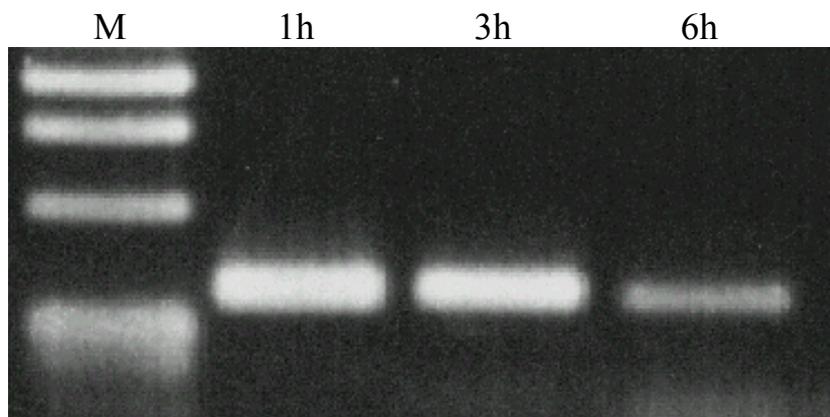
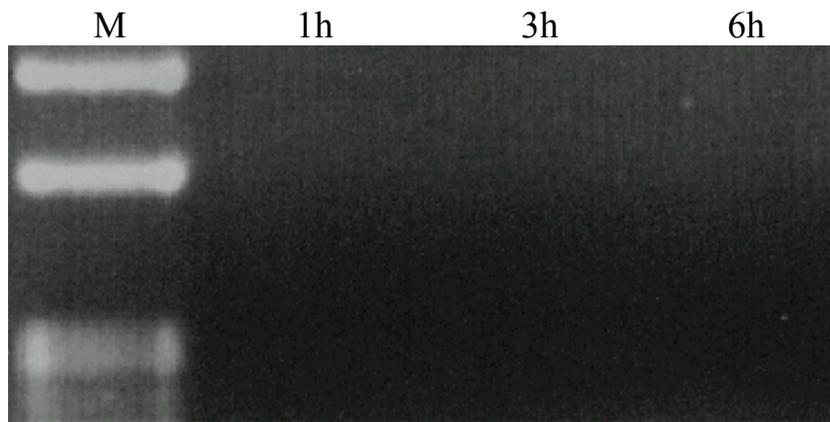


Abbildung 47/48. *IL-8* Genexpression nach 1, 3 und 6h im nicht infizierten (Abb. 47) bzw. mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 infizierten (Abb. 48), rekonstituierten humanen Vaginalepithel.

Im ELISA wurde die IL-8-Konzentration auf Proteinebene nach 12h bestimmt. Es zeigte sich, dass eine Infektion mit *C. albicans* die IL-8-Konzentration gegenüber dem nicht infizierten Modell verdoppelte. Auch die Zugabe von PMN zum nicht infizierten RHVE erhöhte die IL-8-Konzentration verglichen mit der nicht infizierten Schleimhaut ohne PMN. Durch die Zugabe von PMN zum Infektionsmodell verdoppelte sich die IL-8-Konzentration ebenfalls. Die Zugabe von Proteinaseinhibitoren hingegen veränderte die IL-8-Konzentration nur unwesentlich (**Tab. 5**).

Probe	IL-8-Konzentration in pg/ml
nicht infiziert	143
nicht infiziert + PMN	240
infiziert	302
infiziert + PMN	521
infiziert + Pepstatin A	264
infiziert + Ritonavir	333

Tabelle 5. Interleukin-8-Proteinkonzentration der verschiedenen Proben in pg/ml nach 12h.

3.4 In vivo-Untersuchungen zur Bedeutung der Sap bei der vaginalen Kandidose

Nachdem *ex vivo* ein typisches *SAP*-Expressionsmuster für den Verlauf der Infektion festgestellt werden konnte, interessierte nun natürlich die Vergleichbarkeit zur *in vivo*-Situation. Dazu wurden Abstriche von 4 Patientinnen mit einer unbehandelten vaginalen Kandidose aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Innenstadt der LMU München hinsichtlich der *SAP*-Expression untersucht. Ein Teil der Proben wurde dazu verwendet, den Erreger der Infektion mikrobiologisch und mittels biochemischer Charakterisierung zu bestimmen. In allen vier Fällen konnte *C. albicans* als Erreger identifiziert werden. Der andere Teil wurde für die RNA-Isolierung und eine anschließende RT-PCR verwendet. Bei Abwesenheit der Reversen Transkriptase konnte nach der PCR bei keiner Patientenprobe *SAP1-10*-Genprodukte nachgewiesen werden. Dadurch wurde bewiesen, dass keine genomische DNA-Kontamination vorlag. Bei den meisten Patientinnen kam es zur Expression von *SAP1*, *6*, *9* und *10*. Zwei Patientinnen waren positiv für *SAP5*, und ein Patient exprimierte *SAP2*. *SAP3*, *4*, *7* und *8* wurden nie exprimiert (**Abb. 49/50**). Die *SAP*-Expression *in vivo* ist also der *ex vivo*-Expression sehr ähnlich. Somit konnte den Sap von *C. albicans* auch eine für die Praxis relevante Bedeutung als Virulenzfaktor zugewiesen werden, was besonders interessant ist im Hinblick auf neue therapeutische Optionen zur Behandlung vaginaler Kandidosen.

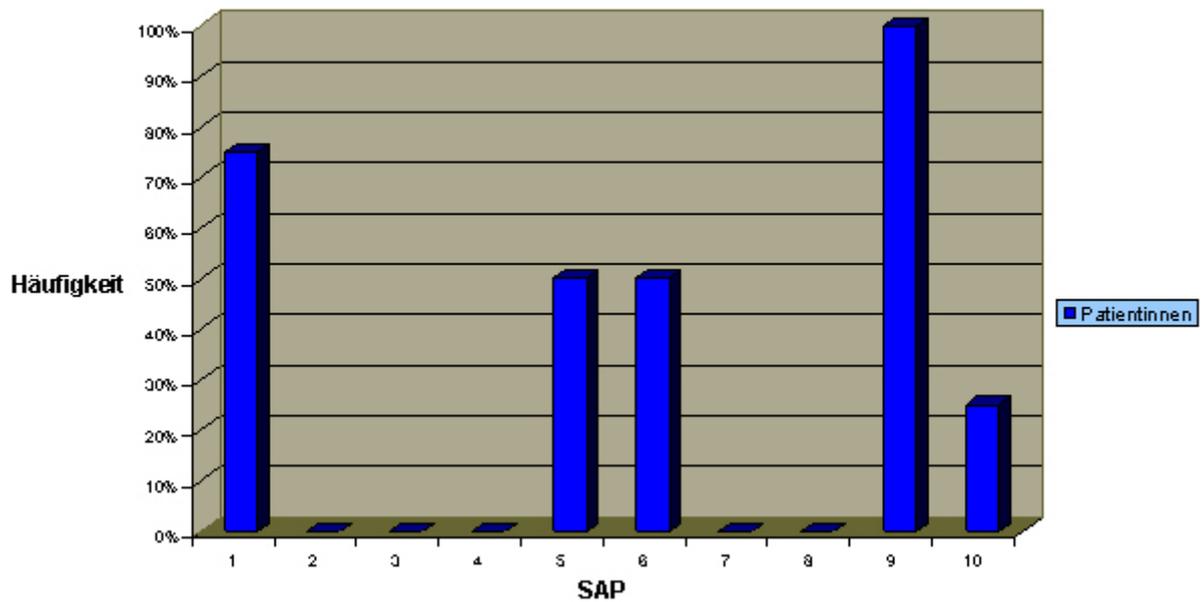


Abbildung 49. Häufigkeit der Expression der zehn verschiedenen *SAP*-Gene *in vivo* bei vier Patientinnen mit einer vaginalen *Candida albicans*-Infektion.

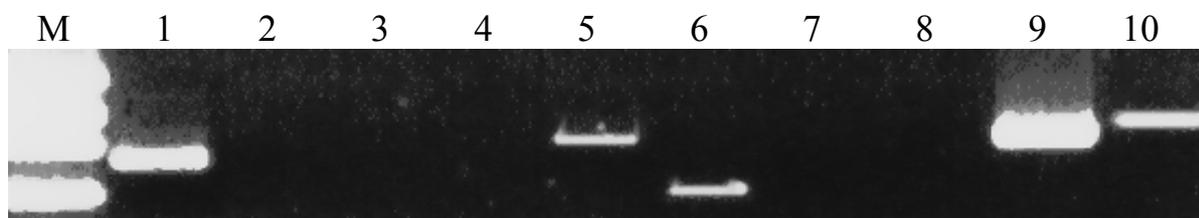


Abbildung 50. *SAP*-Genexpressionsmuster einer der vier untersuchten Patientinnen .

3.5 Dreidimensionale Struktur von Sap2 mit Proteinaseinhibitoren

Die Suche nach spezifischen Proteinaseinhibitoren für die Hemmung der Sap von *C. albicans* wird wesentlich erleichtert durch die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Enzyms und besonders des aktiven Zentrums. Dadurch ist es möglich, gezielt Wirkstoffe zu entwickeln, die besonders starke Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum der Sap eingehen. Im Jahre 1995/1996 gelang es zwei Arbeitsgruppen die dreidimensionale Struktur von Sap2 kombiniert mit einem Proteinaseinhibitor röntgenkristallographisch darzustellen (1, 27) (**Abb. 51**). Die Auflösung liegt bei Proteinkristallen üblicherweise zwischen 1,5 und 3 Å und ist stark von der Qualität des erzeugten Kristalls abhängig. Diese Struktur konnte mit Hilfe von computergestützten Wechselwirkungs- und Bindungslängenberechnungen (61) weiter optimiert werden. Dadurch erhielt man eine realistischere Struktur von Sap2 mit dem Proteinaseinhibitor A70450. Man konnte auch die wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen (violett gestrichelt) zwischen dem aktiven Zentrum von Sap2 (gelb) und dem Proteinaseinhibitor A70450 bildlich darstellen (**Abb. 52**). Die optimierte Struktur wurde daraufhin als Vorlage für den Einbau anderer Proteinaseinhibitoren ins aktive Zentrum von Sap2 verwendet.



Abbildung 51. Dreidimensionale Struktur von Sap2 im Komplex mit dem Proteinaseinhibitor A70450 (27).

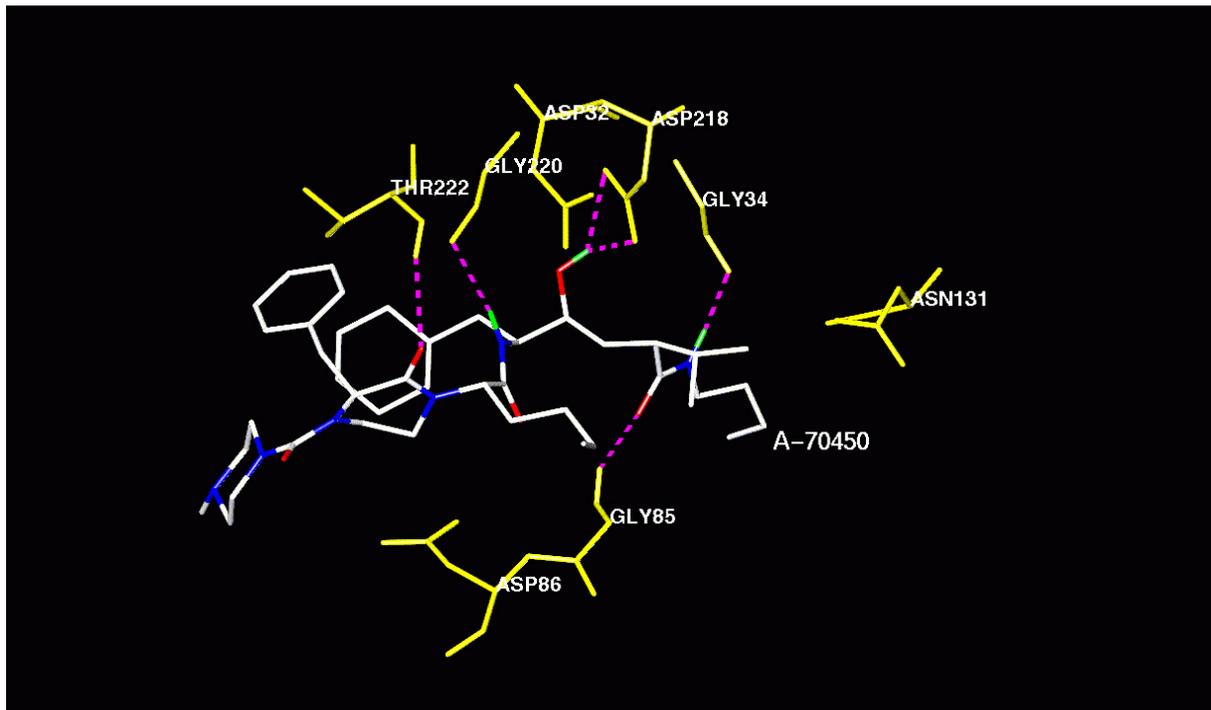


Abbildung 52. Das aktive Zentrum von Sap2 im Komplex mit dem Proteinaseinhibitor A70450. Die Aminosäuren (gelb) von Sap2 bilden Wasserstoffbrückenbindungen (violett gestrichelt) zu den Sauerstoffmolekülen (rot) bzw. Wasserstoffmolekülen (grün) des Inhibitors aus. Weiß: Kohlenstoffgerüst des Inhibitors; blau: Stickstoffmoleküle des Inhibitors.

3.5.1 Optimierte Struktur von Sap2 mit Pepstatin A

Cutfield et al. haben in einer Publikation beschrieben, wie Pepstatin A im aktiven Zentrum von Sap2 liegt (27). Die zugehörigen Röntgenkristallstrukturdaten des Komplexes wurden jedoch nie veröffentlicht, vielleicht weil die Auflösung mit mehr als 3 Å relativ unpräzise war. Es wurde daher versucht, mit Hilfe der optimierten Sap2-Struktur eine Vorstellung davon zu entwickeln, welche dreidimensionale Form dieser Sap2-Pepstatin A-Komplex aufgrund seiner Energie am wahrscheinlichsten annimmt (**Abb. 53**). Im aktiven Zentrum sieht man deutlich die H-Brücke zwischen der typischen OH-Gruppe jedes Proteinaseinhibitors in der Mitte des Moleküls und den beiden Aspartaten (Asp) Asp 32 und Asp 218. Zudem bildet sich eine H-Brücke zwischen Threonin (Thr) 222 und den Peptidbindungen der beiden Valin (Val)-Aminosäuren des Pepstatins aus. Weitere H-Brücken zwischen den Stickstoffen des Arginins (Arg) 192 und den beiden Carboxylat-Sauerstoffen des C-terminalen Endes des Pepstatins sowie zwischen Asparagin (Asp) 131 und der OH-Gruppe des endständigen Statins von Pepstatin A halten den Inhibitor im aktiven Zentrum (**Abb. 54**). Dieses Modell stimmt sehr genau mit der

Beschreibung von Cutfield überein, der ebenfalls viele der erwähnten H-Brückenbindungen nachweisen konnte (27).

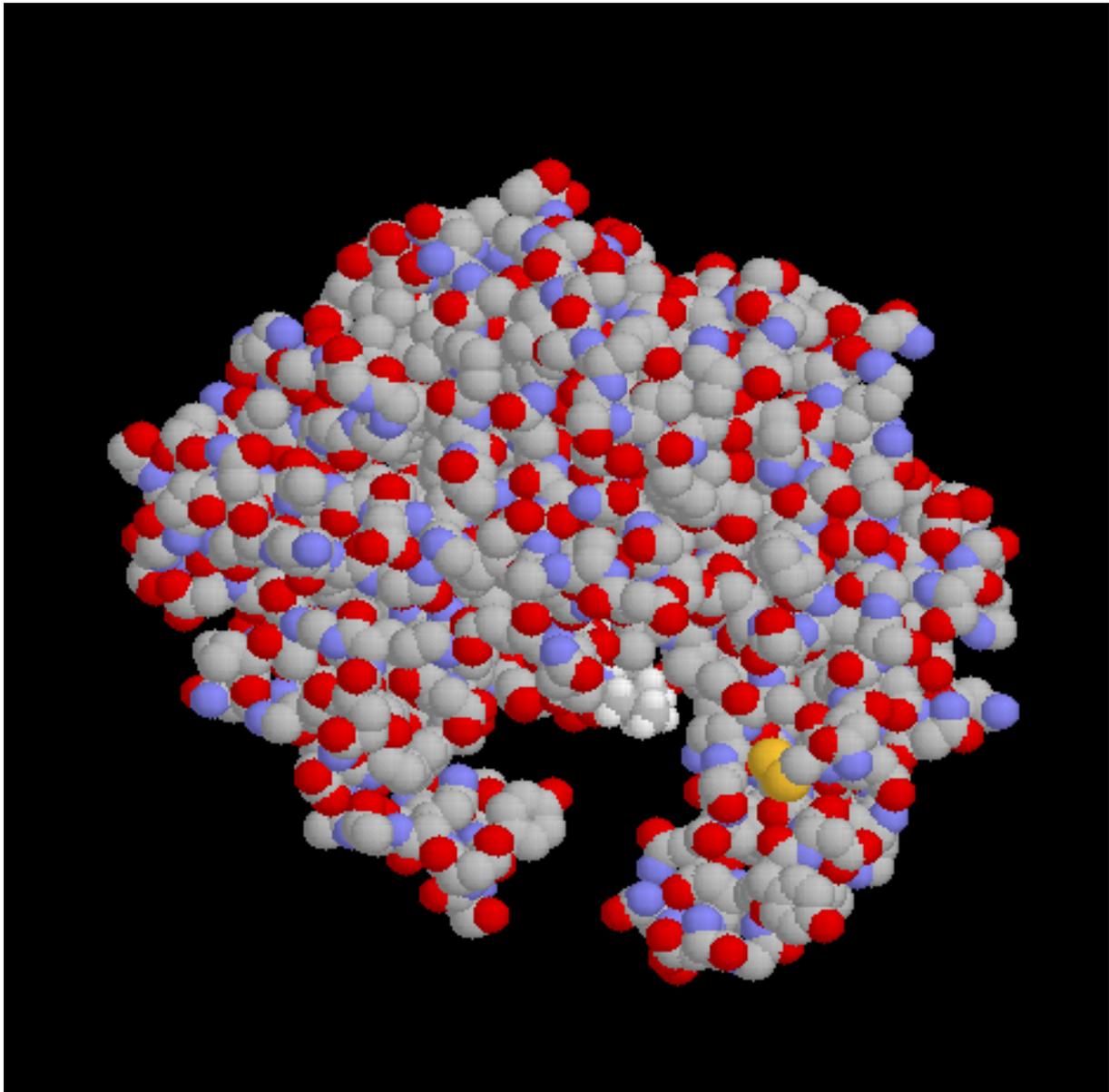


Abbildung 53. Räumliches Modell des optimierten Sap2-Enzyms mit dem Proteinaseinhibitor Pepstatin A. Grau: Kohlenstoff; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff; gelb: Schwefel; weiß: Pepstatin A. Die Wasserstoffatome wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

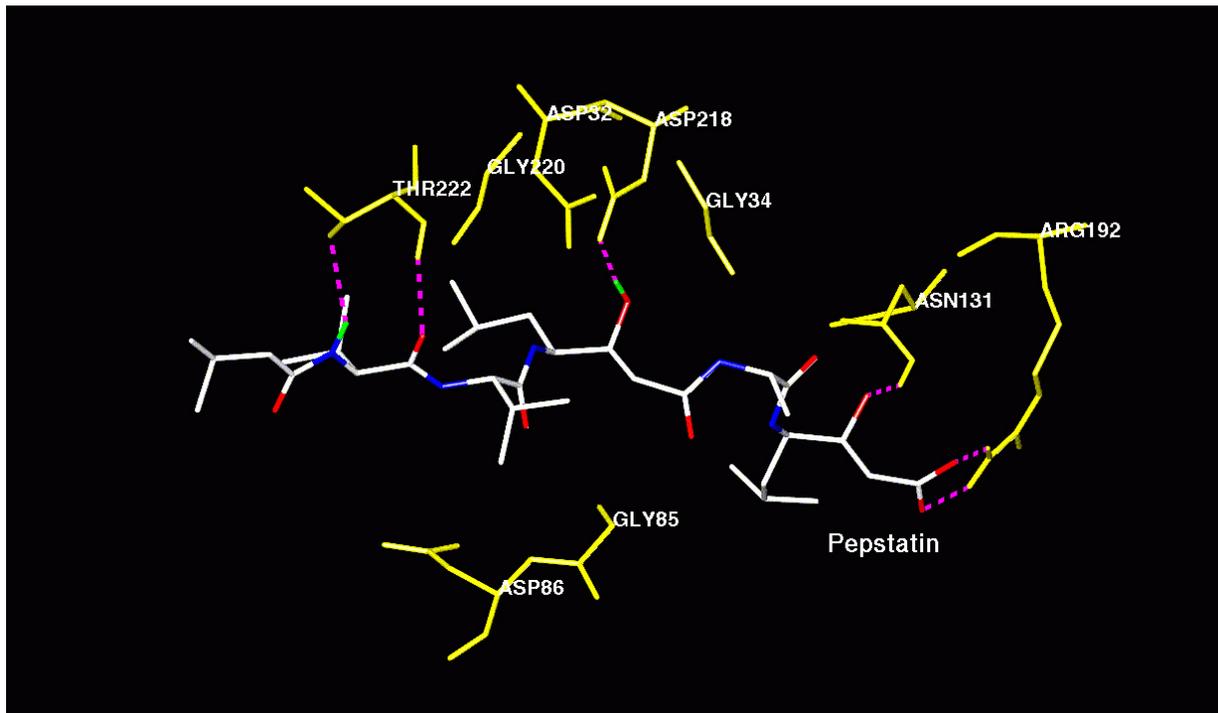


Abbildung 54. Optimierte räumliche Struktur des aktiven Zentrums von Sap2 in Wechselwirkung mit Pepstatin A. Gelb: Aminosäuren von Sap2; weiß: Kohlenstoff; violett gestrichelt: H-Brückenbindungen; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

3.5.2 Modellstruktur und Wechselwirkungen von Sap2 mit Ritonavir und Inh18

Neben Pepstatin A wurden auch HIV-Proteinaseinhibitoren und ein spezifischer, gegen Sap von *Candida* gerichteter Proteinaseinhibitor (Inh18) im RHVE auf seine Wirkung untersucht. Um die Ursache der Sap-Hemmung durch diese Hemmstoffe chemisch zu untersuchen, wurde Ritonavir und Inh18 in die optimierte Sap2-Struktur modelliert und die Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum betrachtet. In der Abbildung sieht man, wie Ritonavir im energetisch günstigsten Zustand im aktiven Zentrum von Sap2 liegt (**Abb. 55**). Ritonavir enthält ebenfalls die für Proteinaseinhibitoren wichtige OH-Gruppe, die Wechselwirkungen mit Asp32 und Asp218 eingeht. Außerdem kommt es im Komplex zu zahlreichen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des aktiven Zentrums und Ritonavir. Der aus einer Prager Arbeitsgruppe stammende spezifische Sap-Inhibitor Inh18 (108) konnte ebenfalls mit Hilfe von Molecular-Modelling-Methoden erfolgreich in die optimierte Sap2-Struktur eingebaut werden (**Abb. 56**). Der Hemmstoff besteht aus fünf Aminosäuren. Kernstück des Inhibitors stellt das mittlere Phenylstatin dar, eine künstliche Aminosäure, die eine Hydroxygruppe besitzt und somit Wechselwirkungen mit den beiden Aspartaten im aktiven Zentrum von Sap2 eingeht. Der Stoff passt gut ins aktive

Zentrum des Enzyms (**Abb. 57**). Aufgrund der im Vergleich zu Ritonavir höheren Anzahl an H-Brücken ist anzunehmen, dass dieser speziell gegen *Candida* entwickelte Inhibitor Sap2 besser hemmt als das gegen HIV-Proteinasen entwickelte Ritonavir. Dies wird durch eine Publikation bestätigt, in der durch Messung der inhibitorischen Konzentrationen gezeigt werden konnte, dass Inh18 Sap2 von *C. albicans* 200fach besser hemmt als Ritonavir (108). Dass diese Ergebnisse im Vaginalschleimhaut-Modell nicht so deutlich ausfallen liegt sicherlich daran, dass Inh18 speziell gegen Sap2 von *C. albicans* gerichtet ist. Bei der vaginalen Kandidose spielt aber vor allem auch Sap1 eine wichtige Rolle, dessen dreidimensionale Struktur bisher immer noch unbekannt ist. Durch die Untersuchung der Kristallstruktur der anderen wichtigen Sap-Isoenzyme sollte es möglich sein, spezifische Hemmstoffe gegen unterschiedliche Isoenzyme der Sap-Familie zu entwickeln. Dies stellt eine aussichtsreiche Therapieoption von vaginalen Kandidosen in der Zukunft dar.

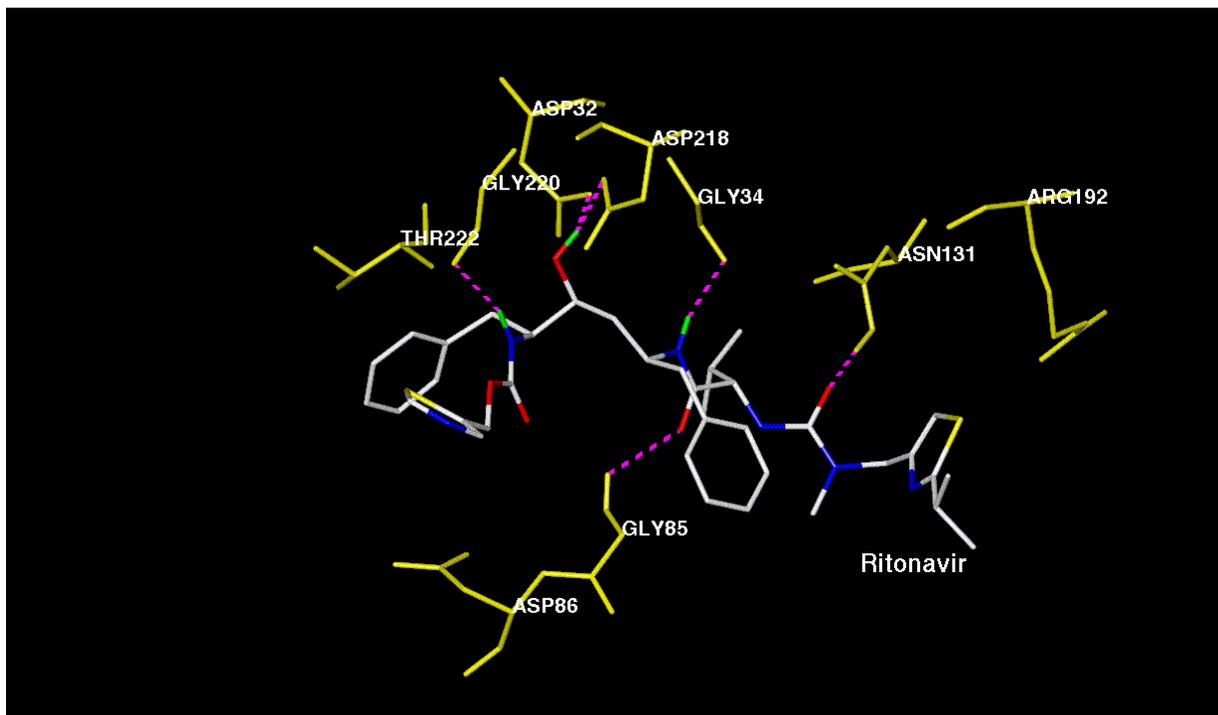


Abbildung 55. Modellvorstellung des HIV-Proteinaseinhibitors Ritonavir und dessen Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum von Sap2.



Abbildung 56. Räumliches Modell von Sap2 (grün) in Kombination mit dem von Pichova (108) entwickelten spezifischen *Candida albicans* Proteinaseinhibitor Inh18.

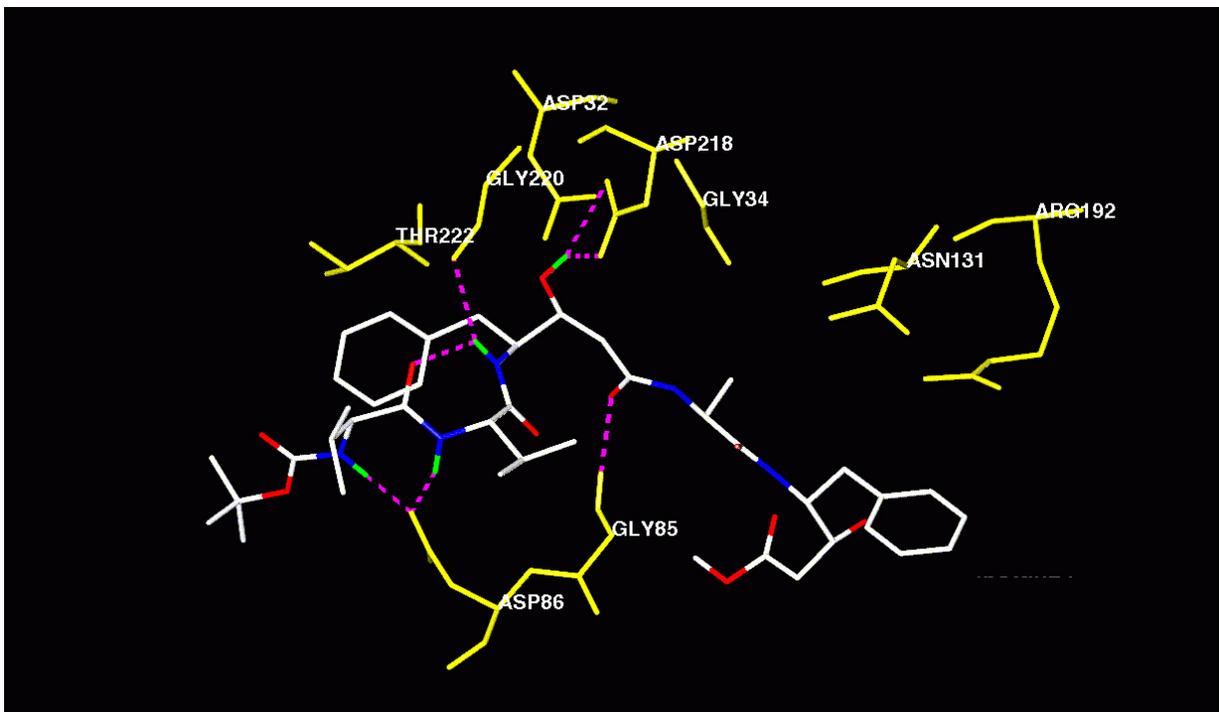


Abbildung 57. Modellvorstellung des spezifischen *Candida albicans* Proteinaseinhibitors Inh18 im aktiven Zentrum von Sap2. Mindestens 6 Wasserstoffbrückenbindungen (violett gestrichelt) halten den Hemmstoff im aktiven Zentrum und führen dadurch zu einer hohen Wirksamkeit des Inhibitors.

4 DISKUSSION

4.1 Das RHVE und seine Eignung für ein Vaginalkandidosemodell

Histologisch zeigt das RHVE eine große Übereinstimmung mit der *in vivo*-Situation (48, 117). Das Epithel zeigt einen kompakten Aufbau, wobei die einzelnen Zellschichten deutlich voneinander differenzierbar sind. Die einzelnen Zellen weisen eindeutige Keratinozyten-Charakteristika wie Desmosomen, Tonofilamente und Keratohyalin granula auf. Neben der morphologischen Ähnlichkeit konnte in immuno-histochemischen Untersuchungen auch die Expression spezifischer Differenzierungsmarker des reifen Vaginalepithels (Zytokeratin K1/K10, Involukrin, Transglutaminase 1) im Modell gezeigt werden (117). Auch bilden diese Tumorzellen der A431-Zelllinie keine Hornschicht aus. Bei den Untersuchungen zeigte sich licht- und elektronenmikroskopisch eine gute Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Chargen des RHVE, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hindeutet. Bisher wurden für die Etablierung von experimentellen vaginalen Kandidosen Tiermodelle verwendet (8, 30, 31, 125). Da die Vergleichbarkeit von Tiermodellen und der *in vivo*-Situation häufig fragwürdig erscheint und auch aus ethischer Sicht die Durchführung von Tierversuchen problematisch ist, stellt das RHVE eine sinnvolle Alternative dar. Es lässt sich also feststellen, dass es sich bei dem verwendeten RHVE um ein immer in ausreichender Menge zur Verfügung stehendes, funktionsfähiges und der menschlichen Vaginalschleimhaut sehr ähnliches Modell handelt.

Auf der Basis dieses Ergebnisses sollte nun auch geklärt werden, ob es sich auch als Modell der vaginalen Kandidose eignet. Hierzu wurde das RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 infiziert. *In vivo* ist eine vaginale *C. albicans* Infektion durch weißliche, abwischbare Auflagerungen an der Vagina und einen weißen, wässrigen bis „cottage-cheese“-artigen Ausfluss geprägt. Es kommt zu einem ausgeprägten Erythem und Ödemen im Bereich der Vulva (55, 100, 126, 147). Im Schleimhautmodell der vaginalen Kandidose konnten diese Veränderungen ebenfalls nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung mit der *in vivo*-Infektion. Einziger Unterschied im Vergleich zu tierischen oder menschlichen Modellen war die nicht vorhandene zelluläre und humorale Immunantwort.

Ein wichtiger Vorteil dieses Modells ist, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowohl histologische, immunelektronenmikroskopische als auch molekularbiologische Untersuchungen parallel durchgeführt werden können.

4.2 Virulenzuntersuchungen am RHVE und Einfluss einzelner Sap

Nachdem die Ähnlichkeit des Modells mit der *in vivo*-Situation einer vaginalen Kandidose gezeigt werden konnte, sollte nun die Bedeutung der *SAP*-Genfamilie für den Infektionsverlauf näher charakterisiert werden. Das Vorhandensein einer ganzen *SAP*-Genfamilie lässt darauf schließen, dass die einzelnen Sap von *C. albicans* unterschiedliche Funktionen besitzen. In *C. albicans*-Zellkulturen konnte *in vitro* eine differentielle Regulation der *SAP*-Gene in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen, Temperatur und Zellmorphologie nachgewiesen werden (54, 66). Auch bei dem hier verwendeten *ex vivo*-Vaginalkandidose-Modell kam es zeitabhängig zu einer differentiellen Expression von Sap, was auf Gen-Ebene mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Erstmals wurden alle zehn Mitglieder der *SAP*-Genfamilie bei einer Genexpressionsstudie einer humanen Kandidose untersucht. Dabei spielten zu Beginn der Infektion vor allem Sap1 und Sap2 eine bedeutende Rolle. *SAP2*, 9 und 10 wurden während des gesamten Infektionsverlaufs exprimiert, wobei Sap9 und 10 als konstitutiv exprimierte, zellwandverankerte Proteinasen gelten, die nicht extrazellulär sezerniert werden (Felk; nicht publiziert). *SAP1* und in geringerem Umfang *SAP4* und 5 konnten zeitgleich mit dem ersten Auftreten von Läsionen und dem Eindringen erster Hefen in das RHVE nachgewiesen werden. Im weiteren Infektionsverlauf waren schließlich *SAP1*, 2, 4-6, 9 und 10 und manchmal *SAP7* und 8 exprimiert (131). Im Gegensatz zum oralen und kutanen Infektionsmodell (129, 130) kam es während des gesamten Infektionsverlaufs zu keiner Expression von *SAP3*. Sap2 scheint folglich eine wichtige Rolle für die Adhärenz des Pilzes an die Vaginalschleimhaut zu spielen, während Sap1 wichtig ist für die Invasion des Pilzes in das Epithel. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die Sap-Sekretion in Übereinstimmung mit der Expression von *SAP*-Transkripten. Die besondere Bedeutung von Sap1 und 2 konnte durch die entsprechenden *Asap1*- respektive *Asap2*-defizienten Mutanten bestätigt werden, deren Virulenz im Vergleich zum Wildtyp deutlich abgeschwächt war. Die Ergebnisse stimmen auch mit Ergebnissen einer italienischen Arbeitsgruppe überein, die in einem Ratten-Vaginalkandidosemodell mit Hilfe von Northern Blot-Analysen die Expression von *SAP1* und *SAP2* nachweisen konnte. Sie konnte zeigen, dass der Einsatz von Einfachmutanten aus der Gruppe *SAP1-3* im Gegensatz zur Dreifachmutante *Asap4-6* zu einer signifikanten Virulenzabschwächung führt. Dabei war vor allem die *Asap2*-Mutante fast avirulent (30, 31).

Die Proteinase Sap2 ist vor allem im sauren Bereich aktiv. Obwohl das Erhaltungsmedium den pH-Wert des RHVE neutral hält, wird zu Beginn der Infektion vor allem *SAP2* exprimiert. Im Gegensatz dazu wird beim ebenfalls neutralen oralen Modell zu Beginn der Infektion besonders *SAP1* und 3 exprimiert. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression der Sap vor allem abhängig ist von der Zellart des Infektionsmodells und nicht vom pH-Wert des umgebenden Mediums. Einen Beweis dafür lieferte ein Versuch, bei dem der

pH-Wert des Erhaltungsmediums auf pH 4,5 eingestellt wurde. Trotz des veränderten pH-Werts wurden dieselben *SAP*-Gene exprimiert. Die Bedeutung von Sap1 wurde zudem durch die Zugabe des rekombinanten Enzyms zum RHVE bestätigt. Die alleinige Zugabe von Sap1 führte zu einer deutlichen Schädigung der *ex vivo*-Vaginalschleimhaut (131).

Um das Ausmaß der Schleimhautschädigung zu quantifizieren, wurde erstmals bei einem *ex vivo*-Kandidose-Modell ein LDH-Test durchgeführt. LDH wird durch die Zerstörung der Keratinozyten ins umliegende Erhaltungsmedium freigesetzt. Dabei zeigte sich, dass durch die Infektion mit der Δ *sap1*- respektive Δ *sap2*-defizienten Mutante die LDH Konzentration deutlich abnahm, d. h. der Schaden zurückging.

Die Expression von *SAP6* ist, wie von anderen Arbeitsgruppen bereits früher *in vitro* nachgewiesen werden konnte (63, 158), verbunden mit einer Hypheninduktion. Da im Versuch erst nach 24h vermehrt Hyphen in das RHVE eindringen, kam es erst zu diesem Zeitpunkt zu einer Expression von *SAP6*. *SAP4* und *5*, die sehr eng mit *SAP6* verwandt sind, wurden in geringem Maße, verglichen mit *SAP1*, bereits nach 14h exprimiert, als es zur Invasion erster Hefezellen in das RHVE kam. Diese Gene scheinen aber für die vaginale Kandidose nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die entsprechende Δ *sap4-6*-Mutante führte nämlich im RHVE zu keiner Reduktion des Schadensbildes verglichen mit der Wildtypinfektion. Vielmehr kam es bei der Δ *sap4-6*-Mutante sogar zu einer ausgeprägteren Schädigung der Schleimhaut. Dies könnte daran liegen, dass die Gene *SAP1 und 2*, welche für die vaginale Kandidose von besonderer Bedeutung sind, kompensatorisch hochreguliert werden.

Zur Expression von *SAP7* und *8* korrelierten keine spezifischen histologischen Veränderungen.

Obwohl das Auftreten erster histologisch erkennbarer Läsionen zeitlich variierte, konnte in allen Infektionsversuchen immer eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten histologischer Veränderungen und den *SAP*-Genexpressionsmustern gezeigt werden.

Das *SAP*-Genexpressionsmuster im RHVE stimmte zudem sehr genau mit der *in vivo*-Situation überein. Um die *in vivo* Ergebnisse zu erhalten, wurden Abstriche von Frauen mit einer unbehandelten vaginalen Kandidose auf *SAP*-Gene untersucht

Einen besonders guten Schutz vor *C. albicans*-Infektionen bietet der in der Vaginalflora von gesunden Frauen natürlich vorkommende Keim *Lactobacillus acidophilus* (104, 105). Diese Beobachtung konnte im infizierten RHVE bestätigt werden. Durch die Zugabe von *Lactobacillus acidophilus*-Keimen ist *C. albicans* nicht mehr in der Lage, sich an die Vaginalschleimhaut anzuhaften. Das RHVE bleibt vollständig erhalten.

4.3 Wirksamkeit von Proteinaseinhibitoren gegen Sap

Der Nachweis histologischer Veränderungen zeitgleich zur Expression bestimmter *SAP*-Muster ist noch kein direkter Beweis dafür, dass die Veränderungen durch die Sap-Aktivität verursacht werden. Es könnten auch andere Virulenzfaktoren für die Schädigung des Epithels verantwortlich sein. Diese Vermutung konnte aber durch den Einsatz der entsprechenden Mutanten widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass die Infektion des RHVE mit der *Asap1*- und *Asap2*-Mutante zu einem deutlich geringeren Schädigungsbild führt als der Wildtyp.

Einen weiteren Beweis dafür, dass Sap wichtige Virulenzfaktoren von *C. albicans* sind, lieferte der Einsatz von Proteinaseinhibitoren. Durch die Zugabe von Pepstatin A, einem klassischen Aspartatproteinaseinhibitor, zum Infektionsmodell wurde das Schädigungsbild deutlich reduziert. Die Fähigkeit zur Adhärenz des Pilzes an das Epithel war nicht mehr vorhanden. Bis auf wenige abgelöste Zellen blieb das RHVE vollständig erhalten. Es wurden auch HIV-Proteinaseinhibitoren wie Ritonavir getestet. Diese sind ebenfalls in der Lage, die Sap von *C. albicans* zu hemmen und somit die Schädigung des Epithels zu verringern, allerdings nicht in dem Maße wie Pepstatin A. Ein speziell gegen Aspartatproteinasen von *Candida* entwickelter Hemmstoff Inh18 führte ebenfalls zu einer Reduktion des Schadens am RHVE. Es liegt daher nahe, dass Proteinaseinhibitoren eine neuartige therapeutische Option zur Behandlung von vaginalen Kandidosen spielen könnten. *In vitro* konnte bereits die inhibitorische Wirkung der HIV-Proteinaseinhibitoren auf die Sap von *C. albicans* nachgewiesen werden (77) und auch im Rattenmodell; im *ex vivo*-Modell der oralen und kutanen Kandidose und natürlich im RHVE zeigte sich eine protektive Wirkung dieser Substanzen (21, 129, 130). Auch in klinischen Beispielen ließ sich ein positiver Effekt der Proteinaseinhibitoren auf den Verlauf von *C. albicans*-Infektionen nachweisen. Seit Einführung der HIV-Proteinaseinhibitoren in die Behandlung von AIDS-Patienten ließ sich ein deutlicher Rückgang der Prävalenz oraler Kandidosen verzeichnen (58, 59). Dieser Befund wird meist mit dem verbesserten Immunstatus der Patienten durch die Behandlung mit HIV-Proteinaseinhibitoren begründet (162). Es gibt allerdings auch Beispiele, wo sich das klinische Bild der *C. albicans*-Infektion deutlich verbesserte, ohne dass es zu einem Anstieg der CD4-Helferzahl kam (22, 58, 59). Die HIV-Proteinaseinhibitoren scheinen also auch *in vivo* einen direkten Einfluss auf die Sap von *C. albicans* auszuüben.

Weshalb die verschiedenen Aspartatproteinasen unterschiedlich stark gegen Sap von *C. albicans* wirksam sind, konnte mit Hilfe von Molecular-Modelling-Untersuchungen gezeigt werden. Hierbei wurden die verschiedenen Proteinaseinhibitoren mit Hilfe von Computerprogrammen in das aktive Zentrum von Sap2 modelliert, dessen dreidimensionale Struktur durch Röntgenkristallstrukturanalyse vor einigen Jahren von zwei Arbeitsgruppen

aufgeklärt werden konnte (1, 27). Anhand der Stärke der Wechselwirkungen, insbesondere der Wasserstoff-Brückenbindungen, konnten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden, das heißt es konnten Aussagen darüber getroffen werden, welche Hemmstoffe besonders gut ins aktive Zentrum passen und somit in der Lage sind, Sap2 zu hemmen. Dabei zeigte sich, dass der von Pichova et al. synthetisierte Hemmstoff Inh18 wesentlich besser ins aktive Zentrum von Sap2 passt als Ritonavir. Diese Ergebnisse stimmen auch mit einer Publikation überein, die zeigt, dass Inh18 Sap2 200-fach stärker hemmt als Ritonavir, den am stärksten wirksamen HIV-Proteinaseinhibitor (108).

4.4 Wirtsantwort auf eine vaginale Infektion mit *C. albicans*

Eine Infektion mit *C. albicans* führt immer zu einer Immunreaktion des Wirtes. Beim Menschen wird die Rolle des Wirtsimmunsystems bei der Bekämpfung einer vaginalen Kandidose bisher nur wenig verstanden, allerdings deutet einiges daraufhin, dass die vaginale Immunantwort auf eine *Candida*-Infektion anders abläuft als die orale Immunantwort, wo CD4⁺ Zellen eine wichtige Rolle spielen (8, 17). Die Einwanderung von Leukozyten in die Genitalorgane ist sowohl beim Menschen als auch beim Tier zyklusabhängig und findet nach der Ovulation statt (140). Dabei spielt beim Menschen vor allem IL-8 eine wichtige Rolle. Dieses Chemokin ist verantwortlich für die Aktivierung und Anlockung von PMN (94). Die IL-8-Produktion wird seinerseits durch die beiden Chemokine IL-1 α and TNF- α induziert. Auch im RHVE konnte eine Expression von *IL-8* durch die Keratinozyten der Schleimhaut nach einer Infektion mit *C. albicans* nachgewiesen werden, während nicht infiziertes Epithel keine Expression von *IL-8* auf Gen-Ebene zeigte. Auf Enzym-Ebene kam es durch die Infektion mit *C. albicans* zu einer Verdopplung der IL-8-Konzentration.

PMN sind wichtige Zellen der angeborenen Immunantwort gegen systemische *C. albicans*-Infektionen und besitzen eine deutliche Aktivität gegen *Candida in vitro* (35, 100). Obwohl PMN in der Vagina der Maus, neben Makrophagen, Lymphozyten und verschiedenen anderen Leukozyten, mit 85% die vorherrschenden Zellen der Immunantwort sind, ist ihre Bedeutung für die Bekämpfung der vaginalen Kandidose bis jetzt unklar. Die Anwesenheit von PMN scheint im Mausmodell die Pilzzellzahl während einer Infektion nicht deutlich zu verringern (41, 125). Während es im oben erwähnten Mausmodell einer vaginalen Kandidose zu einem Einstrom von PMN kommt (9), ist beim Rattenmodell nur eine minimale Infiltration von entzündlichen Zellen zu beobachten (21). Im infizierten RHVE kommt es durch die Zugabe von PMN zu einer deutlichen Reduktion des Schadensbildes. *C. albicans* ist kaum noch in der Lage, in die Vaginalschleimhaut einzudringen. Zudem wird die IL-8-Expression durch die Zugabe von PMN weiter gesteigert. Da das *ex vivo*-Vaginalschleimhautmodell der *in vivo*-Situation am ähnlichsten ist, sollte besonders für die Untersuchung der Wirtsantwort das RHVE verwendet werden,

zumal auch einige Chemokine wie IL-8 bei der Maus nicht identisch zu denen des Menschen sind (140).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vaginale Kandidose ist eine sehr häufige Erkrankung, die vor allem bei Schwangeren auftritt und bei Personen, die durch Pharmaka oder Erkrankungen wie HIV immunsupprimiert sind. Von unterschiedlichen Arbeitsgruppen konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass sekretorische Aspartatproteinasen wichtige Virulenzfaktoren von *C. albicans* sind. In meiner Doktorarbeit habe ich versucht, die Bedeutung der sekretorischen Aspartatproteinasen für den Verlauf von vaginalen *C. albicans*-Infektionen darzustellen. Dazu wurde zunächst ein *ex vivo*-Modell auf der Basis von rekonstituiertem humanem Vaginalepithel etabliert. Dieses besteht aus Zellen einer Vaginalkarzinomzelllinie, die auf einer Polycarbonatträgerschicht ein mehrschichtiges Plattenepithel ausbilden. Dieses Modell ist aus mehreren Gründen sehr gut zur Untersuchung der Erreger-Wirt-Interaktionen und der Bedeutung der Sap als Virulenzfaktoren geeignet und macht somit Untersuchungen am Tier weitestgehend überflüssig. Zum einen entspricht das Modell hinsichtlich der Morphologie in großem Maße der *in vivo*-Vaginalschleimhaut, zum anderen ist es möglich, sowohl histologische und immunelektronenmikroskopische als auch molekularbiologische Untersuchungen parallel durchzuführen, wodurch die gewonnenen Daten besser vergleichbar sind.

In dem RHVE wurden zum ersten Mal alle zehn *SAP*-Gene von *C. albicans* untersucht.

Durch die Infektion des RHVE mit *C. albicans*-Zellen kam es zu einer zeitabhängigen Schädigung des Epithels mit ödematös geschwollenen Keratinozyten, zahlreichen Vakuolen und Ablösung der Zellen aus dem Epithelverband.

Es kam zu einer zeitlich differenzierten Expression von *SAP*-Genen. Im frühen Stadium der Infektion, die charakterisiert ist durch die Adhärenz des Pilzes an die Vaginalschleimhaut, kam es immer zur Expression von *SAP2*, *9* und *10*. Die Invasion des Pilzes in das RHVE war immer mit der Expression von *SAP1* verbunden. In geringerem Maße wurde auch *SAP4* und *5* exprimiert. Im späten Infektionsstadium sind schließlich *SAP1*, *2*, *4-6*, *9* und *10* und manchmal *SAP7* oder *8* exprimiert. Im Gegensatz zum oralen und kutanen Modell kam es nie zur Expression von *SAP3*. Da *SAP9* und *10* als konstitutiv exprimierte, zellwandverankerte Proteinase gelten, die nicht extrazellulär sezerniert werden, kommt wahrscheinlich *SAP1* und *2* besonders zu Beginn der Infektion eine Schlüsselrolle bei der experimentellen vaginalen Kandidose zu. Diese Hypothese konnte mit Hilfe der entsprechenden $\Delta sap1$ - und $\Delta sap2$ -Mutante, denen das entsprechende Gen fehlte, bestätigt werden. Beide Mutanten zeigten eine deutliche Virulenzabschwächung verglichen mit dem Wildtyp. Auch die Invasivität der beiden $\Delta sap1$ - bzw. $\Delta sap2$ -defizienten Stämme ging verglichen mit dem Wildtyp deutlich zurück. So ist im Vergleich zum Wildtyp die $\Delta sap1$ -Mutante in ihrer Invasivität auf 50% reduziert. Die Invasivität der $\Delta sap2$ -

Mutante geht sogar um fast 80% zurück. Die Echtheit der Mutanten konnte durch den Einsatz der entsprechenden Revertanten bestätigt werden, indem gezeigt wurde, dass das Schädigungsmuster des Wildtyps und der Revertante ähnlich sind.

Mit Hilfe polyklonaler, gegen Sap1-3 und Sap4-6 gerichteter Antikörper konnte ein Sap-Sekretionsmuster auf Enzymebene nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass statistisch signifikant mehr Enzyme aus der Gruppe Sap1-3 als aus der Gruppe Sap 4-6 sezerniert werden.

Erstmals wurde mit Hilfe des Laktatdehydrogenase-Tests eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Läsion im RHVE gemacht. Durch die Zerstörung der Keratinozyten kam es zur Freisetzung von LDH, dessen Konzentration indirekt photometrisch bestimmt werden konnte. Die geringste LDH-Konzentration zeigte das nicht infizierte RHVE. Die LDH-Konzentration der Revertanten war immer vergleichbar mit dem Wildtyp, das heißt es wurde tatsächlich nur das entsprechende Gen in der Mutante ausgeschaltet und in der Revertante erfolgreich wieder eingeführt. Die LDH-Konzentrationen der beiden Mutanten lag immer deutlich unter der Konzentration des Wildtyps, was die histologisch beobachtete Virulenzabschwächung der beiden Mutanten bestätigt. Ein interessanter Befund war auch die Avirulenz von *C. albicans* im RHVE durch die Zugabe von *Lactobacillus acidophilus*-Keimen. Die LDH-Konzentration dieser Proben war ähnlich niedrig wie die der nicht infizierten Proben des RHVE. *Lactobacillus acidophilus* bietet demnach einen deutlichen Schutz vor *C. albicans*-Infektionen.

Anhand von vaginalen Abstrichen von Patientinnen aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München – Innenstadt-, mit einer vaginalen *C. albicans*-Infektion konnte der Nutzen des *ex vivo*-RHVE gezeigt werden. Das *in vivo*-SAP-Expressionsmuster war dem *ex vivo*-Muster sehr ähnlich. Es kam häufig zur Expression von *SAP1*, *6*, *9* und *10* und manchmal zur Expression von *SAP2* oder *5*. *SAP3* wurde, wie *ex vivo* auch, nie exprimiert.

Hinsichtlich der Wirtsabwehr spielen Zytokine eine besondere Rolle. IL-8 ist wichtig für die Anlockung von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten. Eine Hochregulation von IL-8 auf mRNA-Ebene war auch im RHVE nach Infektion mit *C. albicans* nachweisbar, während nicht infiziertes Epithel keine Expression zeigte. Im Nährmedium für das Vaginalepithel führt die Infektion zu einer Verdopplung der IL-8-Proteinkonzentration, gemessen durch ELISA. Da auch im RHVE chemoattraktive Faktoren durch die Infektion mit *Candida albicans* induzierbar sind, war mein nächstes Experiment die Zugabe von PMN. Durch die Zugabe von PMN zum infizierten RHVE kam es zu einer deutlichen Abschwächung des Schädigungsbildes.

Die besondere Bedeutung der Sap als Virulenzfaktoren bei der vaginalen Kandidose konnte zusätzlich durch den Einsatz von Proteinaseinhibitoren gezeigt werden. Durch die Zugabe der peptidartigen Proteinaseinhibitoren

Pepstatin, Ritonavir und Inh18 kam es zu einer deutlich verminderten Schädigung des rekonstituierten humanen Vaginalepithels durch *C. albicans*. Durch die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Sap2 war es möglich, mit Hilfe von Molecular-Modelling-Untersuchungen diese Proteinaseinhibitoren computergestützt ins aktive Zentrum von Sap2 zu modellieren. Der Inh18, der speziell gegen Sap von *Candida* entwickelt wurde, passte dabei am besten ins aktive Zentrum, was besonders durch die zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen sichtbar wird. Da Sap2 unter den Proteinaseen nicht das einzige wichtige Enzym im Verlauf einer *C. albicans*-Infektion ist, ist es wichtig, mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturanalysen auch die Struktur der anderen Sap zu untersuchen. Dadurch sollte es möglich sein, gezielte Proteinaseinhibitoren gegen die unterschiedlichen Sap zu entwickeln, was einen neuen und hinsichtlich der steigenden Resistenzen gegen herkömmliche Antimykotika auch wichtigen Ansatzpunkt zur Bekämpfung von *Candida albicans*-Infektionen darstellt.

6 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

- Abbildung 1:** Aufbau der Zellwand von *Candida albicans* (100).
- Abbildung 2:** Ergosterol-Biosynthese von Pilzen
- Abbildung 3:** Katalytischer Mechanismus der Spaltung einer Peptidbindung durch die beiden Aspartate im aktiven Zentrum (11).
- Abbildung 4:** Struktur von Sap1 mit Elementen, die in allen Sap gefunden werden. Das *SAP1* Gen wird in ein Präpropeptid translatiert. Die ersten 18 Aminosäuren werden durch die Signalpeptidase im Endoplasmatischen Retikulum abgespalten.
- Abbildung 5:** Dendrogramm der *SAP*-Gene von *C. albicans* (144)
- Abbildung 6:** Differentielle Regulation der *SAP*-Gene bei unterschiedlichen *in vitro* Bedingungen (63)
- Abbildung 7:** *In vivo*-Vaginalschleimhaut aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel (135)
- Abbildung 8:** Strukturformel von Pepstatin A
- Abbildung 9-10:** Strukturformel von Ritonavir und Amprenavir
- Abbildung 11:** Auftrennung der Blutzellen nach ihrer Dichte zur Isolierung von PMN.
- Abbildung 12:** RT-PCR Methode zum Nachweis der *SAP*-Gene auf mRNA Ebene
- Abbildung 13:** Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus (33)
- Abbildung 14:** Reaktion von Laktat zu Pyruvat bei der Glykolyse
- Abbildung 15:** Nicht infiziertes rekonstituiertes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polycarbonatträgerschicht; x 400.
- Abbildung 16:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 6h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Adhäsion der Hefezellen an die Schleimhautoberfläche mit kleineren oberflächlichen Vakuolen im Epithelverband; x 400.

- Abbildung 17:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 14h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Die Hefezellen haben die obere Hälfte des Epithels zerstört. Es kommt zur Bildung zahlreicher Vakuolen und ödematös geschwollenen Keratinozyten. Einige Zellen lösen sich aus dem Epithel ab; x 400.
- Abbildung 18:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Die Pilzzellen sind bis zur Basalzellschicht durchgedrungen. Das Epithel ist fast vollständig zerstört; x 400.
- Abbildung 19:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel 36h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme sieht man, wie die Hefen bis zur Polycarbonatträgerschicht in das Vaginalepithel eingedrungen sind; x 33000.
- Abbildung 20:** *SAP*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR aus RNA 6h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314.
- Abbildung 21:** *SAP*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR aus RNA 14h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314.
- Abbildung 22:** *SAP*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR aus RNA 24 h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314.
- Abbildung 23:** Der Nachweis des Elongationsfaktors *EFBI* dient als Kontrolle dafür, dass das *SAP*-Genexpressionsmuster aus cDNA und nicht aus genomischer DNA stammt.
- Abbildung 24:** *Postembedding-Immunogold*-Markierung mit dem gegen Sap1-3 gerichteten, polyklonalen Antikörper, 12h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Es ist eine erhöhte Menge an Sap1-3- gegenüber Sap4-6-Antigen (s. Abb. 25) in der Zellwand zu finden. Strich = 0,5µm.
- Abbildung 25:** *Postembedding-Immunogold*-Markierung mit dem gegen Sap4-6 gerichteten, polyklonalen Antikörper, 12h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Strich = 0,5µm.

- Abbildung 26/27:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 für 12h (Abb. 26) und zusätzlich Pepstatin A (Abb. 27). Durch die Zugabe von Pepstatin A kommt es zu einem deutlich reduzierten Schädigungsmuster. *C. albicans* ist nicht mehr invasiv, und das Epithel ist fast vollständig intakt; x 400.
- Abbildung 28/29:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 (Abb. 28) und zusätzlich mit Ritonavir, einem HIV-Proteinaseinhibitor (Abb. 29) für 24h. Durch die Zugabe von Ritonavir kommt es zu einer geringeren Schädigung des Epithels. Außerdem dringen kaum noch Pilze in die Schleimhaut ein; x 400.
- Abbildung 30:** *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 und Ritonavir für 24h.
- Abbildung 31:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp und *Lactobacillus acidophilus* für 12h. Durch die fehlende Adhärenz der Hefezellen an die Vaginalschleimhaut aufgrund der Zugabe von Lactobazillen werden sämtliche *Candida*-Zellen bei der Fixierung von der Schleimhaut gespült. Das Gewebe bleibt vollständig intakt; x 400.
- Abbildung 32:** Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 für 12h. Fast alle Zellschichten sind geschädigt. Es bilden sich zahlreiche Vakuolen, und die Keratinozyten sind ödematös geschwollen; x 400.
- Abbildung 33:** Infektion mit der $\Delta sap1$ -Mutante für 12h. Das Schädigungsmuster ist deutlich geringer ausgeprägt als bei der Wildtypinfektion; x 400.
- Abbildung 34:** Infektion des RHVE mit der $\Delta sap2$ -Mutante für 6h. Die *Candida albicans*-Zellen sind kaum in der Lage in die Vaginalschleimhaut einzudringen. Das Epithel ist vollständig erhalten; x400.
- Abbildung 35:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314. Die Pilzzellen sind etwa bis zur Mitte in das Epithel eingedrungen. Es bilden sich zahlreiche Vakuolen; x 400.

- Abbildung 36:** Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit der *Δsap4-6*-Mutante. Das Epithel ist bis auf die Basalzellschicht geschädigt; x 400.
- Abbildung 37:** *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit der *Δsap1* Mutante für 12h.
- Abbildung 38/39:** Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 (Abb. 38) und der *sap2*-Revertante (Abb. 39) für 6h. Das Schädigungsmuster der Revertante ist der Wildtypinfektion sehr ähnlich; x 400.
- Abbildung 40/41:** Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 (Abb. 40) und der *sap1*-Revertante (Abb. 41) für 12h. Das Schädigungsmuster der Revertante ist der Wildtypinfektion sehr ähnlich; x 400.
- Abbildung 42:** Infektion des RHVE mit dem Sap1-Enzym für 6h führt zu einer deutlichen Schädigung des Epithelverbands mit zahlreichen Vakuolen; x 400.
- Abbildung 43:** Exposition des RHVE gegenüber dem Sap2-Enzym für 6h führt zu geringen interzellulären Ödemen. Die Schädigung des Epithels fällt im Vergleich zur Infektion mit dem Sap1-Enzym deutlich geringer aus; x 400.
- Abbildung 44/45:** Die Infektion des RHVE mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 führt nach 24h zum bekannten Schädigungsbild. Bis auf die Basalzellschicht sind alle Zellschichten geschädigt (Abb. 44). Durch die Zugabe von PMN zum Infektionsmodell nach 19h für 5h ist das Schädigungsbild deutlich reduziert. Die untersten 2-3 Zellschichten sind intakt (Abb. 45); x 400.
- Abbildung 46:** *SAP*-Genexpressionsmuster nach Infektion mit dem *Candida albicans* Wildtyp SC5314 und PMN. Nach 24h Infektion wird nur *SAP1* exprimiert. Die PMN wurden nach 19h dazugegeben.
- Abbildung 47/48:** *IL-8* Genexpression nach 1, 3 und 6h im nicht infizierten (Abb. 47) bzw. mit dem *Candida albicans* Wildtyp infizierten (Abb. 48) rekonstituierten humanen Vaginalepithel.

- Abbildung 49:** Häufigkeit der Expression der zehn verschiedenen *SAP*-Gene *in vivo* bei vier Patientinnen mit einer vaginalen *Candida albicans*-Infektion.
- Abbildung 50:** *SAP*-Genexpressionsmuster einer der vier untersuchten Patientinnen.
- Abbildung 51:** Dreidimensionale Struktur von Sap2 im Komplex mit dem Proteinaseinhibitor A70450 (27).
- Abbildung 52:** Das aktive Zentrum von Sap2 im Komplex mit dem Proteinaseinhibitor A70450. Die Aminosäuren (gelb) von Sap2 bilden Wasserstoffbrückenbindungen (violett gestrichelt) zu den Sauerstoffmolekülen (rot) bzw. Wasserstoffmolekülen (grün) des Inhibitors aus. Weiß: Kohlenstoffgerüst des Inhibitors; blau: Stickstoffmoleküle des Inhibitors.
- Abbildung 53:** Räumliches Modell des optimierten Sap2-Enzyms mit dem Proteinaseinhibitor Pepstatin A. Grau: Kohlenstoff; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff; gelb: Schwefel; weiß: Pepstatin A. Die Wasserstoffatome wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.
- Abbildung 54:** Optimierte räumliche Struktur des aktiven Zentrums von Sap2 in Wechselwirkung mit Pepstatin A. Gelb: Aminosäuren von Sap2; weiß: Kohlenstoff; violett gestrichelt: H-Brückenbindungen; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff
- Abbildung 55:** Modellvorstellung des HIV-Proteinaseinhibitors Ritonavir und dessen Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum von Sap2.
- Abbildung 56:** Räumliches Modell von Sap2 (grün) in Kombination mit dem von Pichova (108) entwickelten spezifischen *Candida albicans* Proteinaseinhibitor Inh18.
- Abbildung 57:** Modellvorstellung des spezifischen *Candida albicans* Proteinase-inhibitors Inh18 im aktiven Zentrum von Sap2. Mindestens 6 Wasserstoffbrückenbindungen (violett gestrichelt) halten den Hemmstoff im aktiven Zentrum und führen dadurch zu einer hohen Wirksamkeit des Inhibitors.

7 VERZEICHNIS DER TABELLEN

- Tabelle 1:** Primerpaare zum Nachweis der einzelnen *SAP*-Gene von *C. albicans*
- Tabelle 2:** Primerpaar zum Nachweis von Interleukin 8
- Tabelle 3:** Der Unterschied zwischen der anti-Sap1-3- und der anti-Sap4-6-Markierung ist signifikant ($p < 0,05$), bestimmt mit dem Fisher-Pitman-Test. Dabei ist D der Durchschnitt der Goldpartikelmenge, die in zehn zufällig ausgewählten Zellen gefunden wurde. SA entspricht der dazugehörigen Standardabweichung.
- Tabelle 4:** LDH-Konzentration der unterschiedlichen Stämme in Abhängigkeit von der Zeit.
- Tabelle 5:** Interleukin-8-Proteinkonzentration der verschiedenen Proben in pg/ml nach 12h.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Stewart K, Navaza J, Payne CD, Ray TL (1996) Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: Implications for the design of antifungal agents. *Protein Science* 5: 640-652
2. Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF (1996) Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2835-2841
3. Alexander BD, Perfect JR (1997) Antifungal resistance trends towards the year 2000. *Drugs* 54: 657-678
4. Antonio MAD, Hawes SE, Hillier SL (1999) The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* 180: 1950-1956
5. Arai T, Mikami Y, Yokoyama K (1977) Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils. *Sabouraudia* 15: 171-177
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675-705
7. Bastert J, Schaller M, Korting HC, Evans EGV (2001) Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int J Antimicrob Agents* 17: 81-91
8. Black CA, Eysers FM, Russell A, Dunkley ML, Clancy RL, Beagley KW (1999) Increased severity of *Candida* vaginitis in BALB/c nu/nu mice versus the parent strain is not abrogated by adoptive transfer of T cell enriched lymphocytes. *J Reprod Immun* 45: 1-18
9. Black CA, Eysers FM, Russell A, Dunkley ML, Clancy RL, Beagley KW (1998) Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection. *Infect Immun* 66: 1273-1275
10. Bluestein D, Rutledge C, Lumsden L (1991) Predicting the occurrence of antibiotic-induced candidal vaginitis. *Fam Pract Res J* 11: 319-326

11. Böhm HJ, Klebe G, Kubinyi H (1996) Wirkstoffdesign. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg Berlin Oxford, 487-504
12. Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. Mol Microbiol 28: 543-554
13. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA (1999) Acid production by vaginal flora *in vitro* is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. Infect Immun 67: 5170-5175
14. Boyum A (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest Suppl 97: 7
15. Brown TA (1999) Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 2. korr. Auflage, 253-275
16. Butz-Jørgensen E (1990) Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand 48: 61-69
17. Cantorna MT, Balish E (1991) Role of CD4+ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. Infect Immun 59: 2447-2455
18. Capobianco JO, Lerner CG, Goldman RC (1992) Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of *Candida albicans* aspartic proteinase. Anal Biochem 204: 96-102
19. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG (1997) Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. AIDS 11: 1839-1844
20. Casal M, Linares MJ (1981) The comparison of six media for chlamydospore production by *Candida albicans*. Mycopathologica 76: 125-128
21. Cassone A, Boccanera M, Adriani D, Santoni G, De Bernardis F (1995) Rats clearing vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antibody mediated resistance to vaginal reinfection. Infect Immun 63: 2619-2624

22. Cauda R, Tacconelli E, Tumbarello M, Morace G, DeBernardis F, Torosantuci A, Cassone A (1999) Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 21: 20-25
23. Centers for Disease Control and Prevention (1998) Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. *MMWR* 47 (no. RR-1)
24. Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, de Repentigny L (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartic proteinase. *Infect Immun* 64: 4514-4519
25. Colonna-Romano S, Leone A, Maresca B (1998) Differential-Display-Reverse-Transcription-PCR (DDRT-PCR). Springer, Berlin Heidelberg New York
26. Cotter G, Kavanagh K (2000) Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci* 57: 241-249
27. Cutfield SM, Dodson EJ, Anderson BF, Moody PC, Marshall CJ, Sullivan PA, Cutfield JF (1995) The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. *Structure* 3: 1261-1271
28. Cutler JE (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218
29. Davies DR (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann Rev Biophys Chem* 19: 189-215
30. De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J, Calderone R (1995) Expression of *Candida albicans* *SAP1* and *SAP2* in experimental vaginitis. *Infect Immun* 63: 1887-1892
31. De Bernardis F, Mondello F, Scaravelli G, Pachi A, Girolamo A, Agatensi L, Cassone A (1999) High Aspartyl Proteinase Production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 37: 1376-1380
32. Debono M (1994) The echinocandins: antifungals targeted to the fungal cell wall. *Exp Opin Invest Drugs* 3: 821-829

33. Degitz K, Volkenandt M (1993) Polymerase-chain-reaction, Hautarzt 44: 681-689
34. Denning DW (1997) Echinocandins and pneumocandins – a new antifungal class with a novel mode of action. J Antimicrob Chemother 40: 611-614
35. Djeu JY, Blanchard DK (1987) Regulation of human polymorphonuclear neutrophil (PMN) activity against *Candida albicans* by large granular lymphocytes via release of a PMN-activating factor. J Immunol 139: 2761-2767
36. English D, Andersen BR (1974) Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 5: 249-252
37. Evron R, Drewe JA (1984) Demonstration of the polysaccharides in the cell wall of *Candida albicans* blastospores, using silver methenamine staining and a sequence of extraction procedures. Mycopathologica 84: 141-150
38. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P (1997) Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. Infect Immun 65: 551-556
39. Felk A, Kretschmar M, Schaller M, Nichterlein T, Sanglard D, Monod M, Korting HC, Schäfer W, Hube B Unpublished results
40. Felk A, Schäfer W, Hube B (2000) *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. Accession number AF146440
41. Fidel PL Jr., Luo W, Steele C, Chabain J, Baker M, Wormley FL (1999) Analysis of vaginal cell populations during experimental vaginal candidiasis. Infect Immun 67: 3135-3140
42. Fidel PL Jr., Lynch ME, Conaway DH, Tait L, Sobel JD (1995A) Circulating CD4 and CD8 T cells have little impact on host defense against experimental vaginal candidiasis. Infect Immun 63: 2403-2408
43. Fidel PL Jr., Lynch ME, Sobel JD (1994) Effects of preinduced *Candida*-specific systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis. Infect Immun 62: 1032-1038

44. Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M (1998) Rapid detection of *Candida albicans* by DNA amplification of common regions from *Candida albicans* secreted aspartic proteinase genes. J Clin Microbiol 36: 395-401
45. Fonzi WA, Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. Genetics 134: 717-728
46. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg Berlin Oxford, 7. Auflage, 744-753
47. Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 13: 122-143
48. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst 51: 1417-1421
49. Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA (1998) *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology 144: 829-838
50. Gillum AM, Tsay EYH, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. Mol Gen Genet 198: 179-182
51. Goerke K, Valet A (2002) Gynäkologie und Geburtshilfe. Urban & Fischer, München Jena, 5. Auflage
52. Gow NAR (1996) *Candida albicans*: morphogenesis and pathogenesis. Jpn J Med Mycol 37: 49-58
53. Gow NAR, Robbins PW, Lester JW, Brown AJP, Fonzi WA, Chapman T, Kinsman OS (1994) A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism or virulence of *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 6216-6220
54. Gow NAR, Hube B, Bailey DA, Schofield DA, Munro C, Swoboda RK, Bertram G, Westwater C, Broadbent I, Smith RJ, Gooday GW, Brown AJP (1995) Genes associated with dimorphism and virulence of *Candida albicans*. Can J Bot 73, Suppl. 1: 335-342

55. Granger, SE (1992) The Aetiology and Pathogenesis of Vaginal Candidosis: An Update. *Br J Clin Pract* 46: 258-259
56. Hartmann M, HIV INFO der Hautklinik der Universität Heidelberg (www.hivinfo.de)
57. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA (1993) The normal vaginal flora, peroxide-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 16: S273-S281
58. Hoegl L, Thoma-Greber E, Röcken M, Korting HC (1998) HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: Results of a study over a period of 2 years. *Mycoses* 41: 321-325
59. Hoegl L, Thoma-Greber E, Röcken M, Korting HC (1998) Shift from persistent oral pseudomembranous to erythematous candidosis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient upon combination treatment with an HIV protease inhibitor. *Mycoses* 41: 213-217
60. Hoetelsmann RM, Meenhorst PL, Mulder JW, Burger DM, Koks CH, Beijnen JM (1997) Clinical pharmacology of HIV protease inhibitors: focus on saquinavir, indinavir and ritonavir. *Pharm World Sci* 19: 159-175
61. Höltje M, Brandt B, Rupp B, Höltje H-D (2001) Die Anwendung von Molecular-Modelling-Methoden in der Arzneimittelforschung. *PZ Prisma*, 8. Jahrgang 4: 217-227
62. Hube B (1998) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15: 65-68
63. Hube B, Monod M, Schofield A, Brown J, Gow NA (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14: 87-99
64. Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schäfer W, Brown AJP, Gow NAR (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2* and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65: 3529-3538

65. Hube B, Turver CJ, Odds FC, Eiffert H, Boulnois GJ, Kochel H, Röchel R (1991) Sequence of the *Candida albicans* gene encoding the secretory aspartate proteinase. *J Med Vet Mycol* 29: 129-132
66. Hube, B (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 7: 55-69
67. Jansons VK, Nickerson VJ (1970) Induction, morphogenesis and germination of the chlamyospore of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 104: 910-921
68. Julius D, Blake A, Blair L, Kunisawa R, Thomer J (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysin-arginin-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37: 129-132
69. Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for the use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137-138
70. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (1998) *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 9. Auflage, 352-378
71. Kimmig R, Knitza R, Girschick G, Hepp F, Wagner C (2000) *Gynäkologie pur – das Arbeitskript*. Börm Bruckmeier, Grünwald, 2. Auflage
72. Kimura LH, Pearsall NN (1978) Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelia. *Infect Immun* 21: 64-68
73. Kirčeva-Ganova E (1969) The value of chlamyospore test in the identification of *Candida albicans*. *Folia Med* 11: 336-342
74. Kleiter EF (1990) *Lehrbuch der Statistik in KMSS*. Bd. 1/2: Niedrigkomplexe Verfahren (Fortsetzung). Deutscher Studien Verlag, Weinheim, Kap.7
75. Koelsch G, Tang J, Loy LA, Monod M, Jackson K, Foundling SI, Lin X (2000) Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1480: 117-131
76. Korting HC (1995) *Dermatotherapie*. Springer, Heidelberg Berlin New York, 74-78, 160-167

77. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Böhmer U, Hube B (1999) Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on *in vitro* activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2038-2042
78. Kulkarni RK, Hollingsworth PJ, Volz PA (1980) Variation in cell surface features of *Candida albicans* with respect to carbon sources. *Sabouraudia* 18: 255-260
79. Luft JH (1961) Epoxy resins. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414
80. Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A (1996) Taschenatlas der Pharmakologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 3. Auflage, 280-281
81. MacDonald F, Odds FC (1983) Virulence for mice of a proteinase secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 129: 431-438
82. Maertens J, Vrebos M, Boogaerts M (2001) Assessing risk factors for systemic fungal infections. *Eur J Cancer Care* 10: 56-62
83. Magee BB, Hube B, Wright RJ, Sullivan PJ, Magee PT (1993) The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect Immun* 61: 3240-3243
84. Maneu V, Cervera AM, Martinez JP, Gozalbo D (1996) Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF-1 β . *FEMS Microbiology Letters* 145: 157-162
85. McCourtie J, Douglas LJ (1981) Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun* 32: 1234-1241
86. McCourtie J, Douglas LJ (1984) Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 45: 6-12
87. Meyer SA, Ahearn DG, Yarrow DG (1984) The genus *Candida* Berkhout. In: Kreger-van Rij NJW (ed) *The yeast: a taxonomy study*. Elsevier Science Publ., Amsterdam 585-844

88. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D (1998) Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144: 2731-2737
89. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D (1994) Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13: 357-368
90. Morrow B, Srikantha T, Anderson J, Soll DR (1993) Coordinate regulation of two opaque-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun* 61: 1823-1828
91. Morschhäuser J, Blum-Oehler G, Hacker J (1997) Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Species. *Med Welt* 48: 352-357
92. Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J (1997) Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 153: 349-355
93. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
94. Murphy PM (1996) Chemokine receptors: structure, function, and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 47-64
95. Mutschler E, Schäfer-Korting M (1996) Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 7. Auflage: 705-715
96. Newman GR, Jasani B (1984) Post-embedding immunoenzyme techniques. In: Polak JM, Varndell IM (Eds.) *Immunolabelling for Electron Microscopy*. Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam New York Oxford 53-70
97. Niewerth M, Korting HC (2001) Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 44: 361-367
98. Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Leon-Gil C, Martinez-Gonzalez J, Leon-Regidor MA, Ibanez-Lucia P, Torres-Rodriguez JM (1997) Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors

- and assessment of systemic antifungal therapy. *Intensive Care Med* 23: 23-30
99. Nolting S, Fegeler K (1993) *Medizinische Mykologie*. Springer, Heidelberg Berlin New York, 4. Auflage, 61-101
100. Odds FC (1988) *Candida and Candidosis*. Baillière Tindall, London, Second edition
101. Odds FC (1994) *Candida* species and virulence. *ASM News* 60: 313-318
102. Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W (1993) Mechanism of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 61: 4560-4568
103. Ollert MW, Wende C, Gorlich M, McMullan-Vogel CG, Borg von Zepelin M, Vogel CW, Korting HC (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
104. Osset J, Bartolome RM, Garcia E, Andreu A (2001) Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* 183: 485-491
105. Osset J, Garcia E, Bartolome RM, Andreu A (2001) Role of *Lactobacillus* as protector against vaginal candidiasis. *Med Clin (Barc)* 117: 285-288
106. Patton DL, Thwin SS, Meier A, Hooton TM, Stapleton AE, Eschenbach DA (2000) Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 183: 967-973
107. Pfaller MA (1994) Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Diseases* 19 (Suppl.), S8 S13
108. Pichová I, Pavlíčková L, Dostál J, Dolejší E, Hrušková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Souček M (2001) Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 268: 2669-2677

109. Polak A (1997) Die antimykotische Therapie- ein endloser Kampf. Birkhäuser Verlag, Basel, 22-69
110. Poulain D, Tronchin G, Dubremetz JF, Biguet J (1978) Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann Microbiol* 129: 141-153
111. Preusser HJ (1982) *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*. Biologie Cytologie, Wirkung von Imidazolderivaten. Fischer, Stuttgart, New York 37-109
112. Proteindatenbank (PDB): www.rcsb.org/pdb/
113. Pschyrembel W (1994) Klinisches Wörterbuch. De Gruyter, Berlin, New York, 257. Auflage
114. Quadripur SA (1996) Pilze und Pilzerkrankungen. Georg Thieme, Stuttgart, 10-12, 36-51
115. Rassner G, Steinert U (1990) Dermatologie: Lehrbuch und Atlas. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 3. Auflage
116. Rieth H (1975) Systematik und Morphologie der pathogenen Pilze. In: Hartung J, Lubach D (Eds.) Mykosen. Georg Thieme, Stuttgart, 5-29
117. Rosdy M, Bernard BA, Schmidt R, Darmon M (1986) Incomplete epidermal differentiation of A431 epidermoid carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 295-300
118. Ross TK, DeBernardis F, Emerson GW, Cassone A, Sullivan PA (1990) The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 136: 687-694
119. Rote Liste^R Service GmbH (2002) Rote Liste 2002. Editio Cantor Verlag GmbH, Aulendorf
120. Rüchel R (1992) In: New Strategies in Fungal Disease. Bennett JE, Hay RJ, Peterson PK (eds.) Churchill Livingstone, Edinburgh, 17-31
121. Rüchel R, Ritter B, Schaffrinski M (1990) Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. *Zentralbl Bakteriol* 273: 391-403

122. Rüchel R, Trost M (1981) A study of the structural conversions of two carboxyl proteinases employing electrophoresis across a pH-gradient. In: Allen RC, Arnaud P (eds.) Electrophoresis'81, de Gruyter, Berlin, 667-676
123. Rüchel R, Zimmermann F, Böning-Stutzer B, Helmchen U (1991) Candidiasis visualized by proteinase-directed immunofluorescence. Virchows Arch A Pathol Anat 419: 199-202
124. Russell MW, Mestecky J (1988) Induction of the mucosal immune response. Rev Infect Dis 10: 440-446
125. Saavedra M, Taylor B, Lukacs N, Fidel PL Jr. (1999) Local production of chemokines during experimental vaginal candidiasis. Infect Immun 67: 5820-5826
126. Samra OM, Mancini DM, Wood E (2002) Vulvovaginitis. eMedicine Journal 3(1): 1-11
127. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 40: 2300-2305
128. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 39: 2378-2386
129. Schaller M, Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen W, Hube B (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Mol Microbiol 34: 169-180
130. Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. J Invest Dermatol 114: 712-717
131. Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B (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

132. Senet JM (1997) Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 14: 6-13
133. Sherwood J, Gow NAR, Gooday GW, Gregory DW, Marshall D (1992) Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol* 30: 461-469
134. Shimp LA (2000) Vaginal and Vulvovaginal disorders. In: Allen LV et al., ed. *Handbook of Nonprescription Drugs*. American Pharmaceutical Association, Washington D.C., 12. Auflage, 117-132
135. Skinethic homepage: www.skinethic.com
136. Slutsky B, Buffo J, Soll DR (1985) High frequency "switching" of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230: 666-669
137. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR (1987) „White-opaque transition“: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169: 189-197
138. Sobel JD (1993) Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 36: 153-165
139. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR (1998) Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 178: 203-211
140. Sonoda Y, Mukaida N, Wang J, Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T, Harada A, Inoue M, Matsushima K (1998) Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol* 160: 6159-6165
141. Staib F (1965) Serum-proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia* 4: 187-193
142. Staib F (1969) Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* 37: 345-348
143. Stanley VC, Hurley R (1969) The growth of *Candida* species in cultures of mouse peritoneal macrophages. *J Pathol* 97: 357-366

144. Stehr F, Felk A, Kretschmar M, Schaller M, Schäfer W, Hube B (2000) Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Mycoses* 43 Suppl 2: 17-21
145. Stewart K, Goldman RC, Abad-Zapatero C (1999) In: *Proteases of Infectious Agents*. Dunn BM (ed.), Academic Press, London, 117-138
146. Stewart TS, Ballou CE (1968) A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis. *Biochemistry* 7: 1855-1863
147. Stier Carson D, Soper DE (2001) Vulvovaginal Candidiasis: Review and Update of Over-the-Counter and Prescription Treatments and the Pharmacist's Role in Patient Counselling. *U.S. Pharmacist (Suppl.)* 1-15
148. Suzuki M, Fukazawa Y (1984) Immunochemical characterization of *Candida albicans* cell wall antigens: specific determinant of *Candida albicans* serotype A mannan. *Microbiol Immunol* 28: 387-402
149. Thanos M, Schönian G, Meyer W, Schweynoch C, Gräser Y, Mitchell RG, Presber W, Tietz HJ (1996) Rapid identification of *Candida*-species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 34: 615-621
150. Tietz HJ, Ulbricht H (1999) *Humanpathogene Pilze der Haut und Schleimhäute: Entnahme, Anzucht, Differenzierung*. Schlütersche, Hannover 23-25, 128-153
151. Tronchin G, Poulain D, Herbaut J, Biguet J (1981) Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. *Eur J Cell Biol* 26: 121-128
152. Tsuchiya T, Fukazawa Y, Kawakita S (1961) Serological classification of the genus *Candida*. In: *Studies on candidiasis in Japan*. Research committee of candidiasis, Tokyo, 34-46
153. Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR (2000) Elevated Phenotypic Switching and Drug Resistance of *Candida albicans* from Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals prior to First Thrush Episode. *J Clin Microbiol* 38: 3595-3607
154. Wade JC, Schimpff SC (1985) Epidemiology and prevention of *Candida* infections. In: Bodey GP, Fainstein V (eds) *Candidiasis*. Raven Press, New York, 111-133

155. Wagner T, Borg von Zepelin M, Röchel R (1995) pH-dependent denaturation of extracellular aspartic proteinases from *Candida* species. *J Med Vet Mycol* 33: 275-278
156. Watts HJ, Very AA, Perera THS, Davies JM, Gow NAR (1998) Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiol* 144: 689-695
157. Wegmann T (1988) Medizinische Mykologie- ein praktischer Leitfaden. Editiones <Roche>, Basel, 4. Auflage, 185-219
158. White TC, Agabian N (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* 177: 5215-5221
159. Wroblewski F, John LS (1955) Lactic dehydrogenase activity in blood. *Exp Biol Med* 90: 210-213
160. Zaugg C, Borg-von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M (2001) Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 69: 405-412
161. Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B (2000) Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. *J Infect Dis* 181 : 1441-1446
162. Zingman BS (1996) Resolution of refractory AIDS-related mucosal candidiasis after initiation of didanosine plus saquinavir. *N Engl J Med* 334: 1674-1675

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.C. Korting für die gewährte konstruktive Unterstützung, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse auf mykologischen Kongressen zu präsentieren.

Prof. Dr. Dr. Heesemann und der DFG danke ich für die Aufnahme ins Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ und die damit verbundene finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. H.-D. Höltje dank ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu arbeiten. Dort habe ich die Untersuchungen zum Molecular-Modelling durchgeführt.

PD Dr. med. M. Schaller danke ich für die intensive Betreuung und die guten Tipps bei der Durchführung der Experimente und für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Frau Januschke, Frau Laude und Frau Oberbauer für die freundliche Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken im Bereich der Licht- und (Immun-)Elektronenmikroskopie.

Heike danke ich besonders herzlich für ihre Geduld und Unterstützung während dieser Zeit.

Bei Marc Späth möchte ich mich für die Entwicklung der vielen Abbildungen bedanken.

10 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Matthias Bein
geboren am: 13.01.1975
in: Wolfsburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildungsdaten

Schulische Ausbildung

1981-1985 Grundschule in Vaterstetten
1985-1994 Gymnasium Vaterstetten, Abschluss: Abitur

Zivildienst

07/94 – 09/95 Rettungsdienst bei der Johanniter Unfallhilfe
Ottobrunn; Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium

10/95 – 10/99 Studium der Pharmazie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Abschluss: 2. Staatsexamen im Oktober 1999;
11/99 – 04/00 Praktikum in der Rathausapotheke, Vaterstetten
01.05.2000 Beginn der Doktorarbeit
12.12.2000 3. Staatsexamen
18.12.2000 Approbation als Apotheker

11 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Å	Angström; $1\text{Å} = 0,1\text{ nm} = 10^{-10}\text{m}$
AIDS	A cquired I mmuno D eficiency S yndrome
Ala	Alanin (Aminosäure)
Arg	Arginin (Aminosäure)
Asp	Asparaginsäure (Aminosäure)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase (Enzym)
bp	base pairs (Basenpaare)
cDNA	Complementary desoxyribonucleid acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphate
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EFB1</i>	Elongationsfaktor-B1 (Gen)

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
H	Wasserstoff
HAART	High active antiretroviral treatment
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
HIV	H uman I mmunodeficiency V irus
IL-1α	Interleukin-1 α (Zytokin)
IL-8	Interleukin-8 (Gen)
IL-8	Interleukin-8 (Zytokin)
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
LB	loading buffer (Ladepuffer)
LDH	Laktatdehydrogenase (Enzym)
Lys	Lysin (Aminosäure)
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinpropansulfat
mRNA	Messenger ribonucleid acid (messenger Ribonukleinsäure)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer

OH	Hydroxygruppe
OsO₄	Osmiumtetroxid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Potenz und Maß für die Wasserstoffionenkonzentration
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
Pst	Phenylstatin
RHVE	Rekonstituiertes humanes Vaginalepithel
RNA	Ribonucleid acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion)
<i>SAP</i>	Sekretorische Aspartatproteinase (Gen)
Sap	Sekretorische Aspartatproteinasen (Isoenzyme)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Thr	Threonin (Aminosäure)
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	Trihydroxymethylaminomethan
<i>URA</i>	Uridin (Gen)
Val	Valin (Aminosäure)
WT	Wildtyp
YPD	Yeast, Peptone, Dextrose