

Der Einfluss von Präparaten der Blaualge
Spirulina platensis
auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)
der Hefe *Candida albicans*

Dissertation
zum Erlangen des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Ulrich Fuchs
geboren
am 10.03.1975
in Kassel

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Marion Hippus
2. Prof. Dr. med. Uwe Wollina
3. Prof. Dr. med. Peter Elsner

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.07.2006

Sophia und ihrer wundervollen Mutter

Abkürzungsverzeichnis

B. : Blastosporen

cpm: counts per minute

DGE: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V.

FKS: Fetales Kälberserum

fL: femto Liter

kb: Kilobasen

Mb: Millionen Basenpaare

ROS: Reactive oxygen species ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot-}$, H_2O_2 , 1O_2)

SD: Standardabweichung des Mittelwertes

SOD: Superoxid Dismutase

Sp. : Spirulina

syn. : synonym

95 % - VB: 95 %: Vertrauensbereich des Mittelwertes

Inhaltsverzeichnis

0. Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Die Hefe <i>Candida albicans</i>	3
1.1.1 Systematische Stellung	3
1.1.2 Medizinische Bedeutung	4
1.1.3 Pathogenese der Candidosen	5
1.1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Schutz- und Virulenzfaktoren von <i>Candida albicans</i>	7
1.2 Die Blaualge <i>Spirulina platensis</i>	9
1.2.1 Systematische Stellung	9
1.2.2 Biochemie und Sekundärmetabolite	10
1.2.3 Verwendung von <i>Spirulina platensis</i>	10
1.2.3.1 [¹³ CO ₂]-Atemtest	10
1.2.3.2 Health Food	11
1.2.4 Analyse der antioxidativen Wirkung von <i>Spirulina platensis</i>	13
1.3 Die Interaktion von <i>Spirulina platensis</i> und <i>Candida albicans</i>	14
2. Ziel der Arbeit	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Chemikalien	16
3.2 <i>Candida albicans</i>	17
3.2.1 Stämme und Kulturbedingungen	17
3.2.2 Hypheninduktion	17
3.3 Messungen von Zellzahl und –volumen	18
3.4 Lucigeninverstärkte Chemilumineszenz	19
3.4.1 Messungen mit kombinierter Zellzahlbestimmung	20
3.4.2 Messungen an <i>Spirulina platensis</i>	20
3.4.3 Messungen an Blastosporen (Vorkulturdauer 6 h)	20
3.4.4 Messungen an Blastosporen (Vorkulturdauer 24 h)	21
3.4.5 Messungen an Hyphen	22
3.5 Statistische Auswertung	23

4. Ergebnisse	24
4.1 Messungen von Zellzahl und –volumen	24
4.2 Gleichzeitige Messung von Zellzahl und ROS	26
4.3 Messung der Chemilumineszenz an <i>Spirulina platensis</i>	28
4.4 Der Einfluss von <i>Spirulina platensis</i> auf die ROS-Bildung von Blastosporen des Stammes 3153A (Vorkulturdauer 6 h)	29
4.5 Der Einfluss der Inkubationszeit auf die ROS-Bildung von Blastosporen des Stammes 3153A	36
4.6 Vergleichende Untersuchungen von Blastosporen (Vorkulturdauer 24 h) des Stammes 3153A nach Behandlung mit <i>Spirulina platensis</i> - Suspension und Vitamin C- Lösung	37
4.7 ROS-Bildung der Stämme 3153A und CA6 unter hypheninduzierenden Kulturbedingungen und deren Beeinflussung durch eine Suspension von <i>Spirulina platensis</i>	39
4.7.1 Stamm 3153A (Vorkulturdauer 24 h)	39
4.7.2 Stamm CA6	41
4.7.2.1 Vorkulturdauer 11 h	41
4.7.2.2 Vorkulturdauer 24 h	44
4.7.2.3 Vergleich zwischen 11- und 24 h Vorkulturdauer	46
4.7.3 Vergleich der Stämme 3153A und CA6 (Vorkulturdauer 24 h)	47
5. Diskussion	49
6. Literatur	54
7. Anhang	

0. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, ob und in welcher Weise wasserlösliche Inhaltsstoffe aus Biomasse der Mikroalge *Spirulina platensis* die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zweier virulenter Stämme (3153A und CA6) der Hefe *Candida albicans* hemmt.

Die Untersuchungen stehen in Zusammenhang mit der Hypothese (Schröter et al., 2000; Sander et al., 2002), dass die Virulenz von *Candida albicans* durch das Ausmaß der ROS-Produktion mitbestimmt wird. Es erscheint daher möglich, dass der wachstumshemmende Einfluss von *Spirulina* bzw. ihrer Inhaltsstoffe auf *Candida* (Gorobets et al., 2001; Özdemir et al. 2004) teilweise auch über eine Hemmung der ROS-Produktion vermittelt wird.

Die Blastosporen der *Candida albicans*-Stämme 3153A und CA6 zeigten in YEPD-Medium (Hefeextrakt, Pepton, Dextrose) über 24 Stunden eine typische Wachstumskurve, beginnend mit einer 4-stündigen „Lag“-Phase, gefolgt von exponentiellem Wachstum bis zur Stunde 10, einer nachfolgenden Phase von dezeleriertem Wachstum und einem stationärem Verhalten in den letzten drei Stunden. Während der Phase des exponentiellen Wachstums nahm das Zellvolumen erst zu und dann wieder ab. Bei beiden Stämmen erreichte die ROS-Produktion (gemessen mit lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz und bezogen auf die Zellzahl) nach 6 Stunden, also im ersten Drittel des exponentiellen Wachstums, ihr Maximum und blieb danach unverändert hoch.

Exponentiell wachsende Blastosporen des Stammes 3153A (6 Stunden Vorkultur in YEPD-Medium) wurden in PBS mit steigenden Konzentrationen einer wässrigen Suspension von *Spirulina*-Biomasse (0,01; 0,1; 1 und 10 mg/mL) versetzt. Nach jeweils 0, 30 und 60 Minuten Inkubation wurde in einer Messkette über 20 Minuten 10-mal die Chemolumineszenz gemessen.

Zu allen drei Zeitpunkten hemmte *Spirulina* konzentrationsabhängig die ROS-Produktion. Die Mittelwerte der Messungen zeigten aber erhebliche Schwankungen, offenbar bedingt durch Fehler bei der Bestimmung der Zellzahlen. So konnte der Effekt auf die Mittelwerte der Messungen nur für die höchste *Spirulina*-Konzentration statistisch gesichert werden. Mit einer linearen Regressions-Analyse aller

Einzelwerte gegen den Logarithmus der *Spirulina*-Konzentration war der Trend jedoch für alle drei Inkubationszeiten statistisch hoch signifikant. Die prozentuale Hemmung durch die vier *Spirulina*-Konzentrationen war zu allen drei Zeitpunkten vergleichbar d. h., es bestand zusätzlich zur Abhängigkeit von der Konzentration keine Abhängigkeit der ROS-Hemmung von der Inkubationszeit.

Die ROS-Bildung stationärer Blastosporen des Stammes 3153A wurde durch Ascorbinsäure allein, in einer äquivalenten Menge, wie sie nach Angaben des Herstellers eine 10 mg/mL konzentrierte *Spirulina platensis*-Suspension enthält, zu 70 % gehemmt. Die Hemmung durch 10 mg/mL konzentrierte *Spirulina platensis*-Suspension betrug dagegen 94 %. Gegenüber dem Wert mit Ascorbinsäure allein ist das eine zusätzliche Hemmung um 81 %.

In YEPD-Medium mit 10 % FKS inkubierte Blastosporen der stationären Phase befanden sich nach 30 Minuten im Stadium der Hyphen-Entwicklung. Nach 60 Minuten Inkubation war die Entwicklung der Hyphen abgeschlossen. Zellen des Stammes 3153A in der stationären Blastosporen-Phase, der Phase der Hyphen-Entwicklung und der Hyphenphase wurden in PBS gewaschen, mit einer *Spirulina*-Konzentration von 10 mg/mL in PBS versetzt und unmittelbar danach gemessen. In allen drei Wachstumsformen wurde die ROS-Bildung zu etwa 80 % gehemmt. Der unter diesen hypheninduzierenden Bedingungen am Stamm 3153A gefundene Effekt von *Spirulina platensis* konnten am Stamm CA6 gleichsinnig nachgewiesen werden.

Spirulina in PBS zeigte selbst nur eine sehr geringe und lediglich angedeutet konzentrationsabhängige Chemolumineszenz.

In den hier beschriebenen Versuchen war in *Candida*-Blastosporen und -Hyphen das Ausmaß der ROS-Hemmung durch wässrige Suspensionen von *Spirulina*-Biomasse unabhängig von der Inkubationszeit. Dieses Fehlen einer zeitlichen Abhängigkeit deutet an, dass die wasserlöslichen Inhaltsstoffe dieser Mikroalge nur ein ROS-„Scavenging“ bewirken. Da Methanolextrakte von *Spirulina* das Wachstum von *Candida* hemmen (Ozdemir et al., 2004), kann die Hypothese von Schröter et al. (2000) jetzt gezielter durch Verwendung methanolische Extrakte und/oder ihrer Inhaltsstoffe weiter überprüft werden.

1. Einleitung

1.1 Die Hefe *Candida albicans*

1.1.1 Systematische Stellung

Die Gattung *Candida* gehört zur Familie der *Cryptococcaceae*. Während andere Gattungen, z. B. *Rhodotorula*, nur Sprosszellen (Blastosporen) bilden, finden sich bei *Candida albicans* und *dubliniensis* neben Sprosszellen auch Pseudomycel und echtes Hyphenmycel. Die *Cryptococcaceae* wiederum zählen zur Ordnung der *Torulopsidales*, deren Arten im Gegensatz zu den echten Hefen (Ordnung der *Endomycetales*), z. B. der Bäckerhefe, keine Endosporen bilden und mit klassischen Methoden keine Anzeichen geschlechtlicher Fortpflanzung erkennen lassen. Sie werden deshalb auch *Endomyces imperfecti* genannt. Die übergeordnete Klasse der *Endomyces* gehört zur Abteilung der echten Pilze, der *Eumycota*. Mit Schleimpilzen und Algenpilzen werden sie zu den *Mycophyta*, der Abteilung der Pilze, zusammengefasst (Wartenberg, 1979; Schubert et al., 1990).

Die Pilze stehen den Tieren sehr viel näher als den Pflanzen. Die Evolution von Pilzen und Tieren verläuft „erst“ seit etwa 1 Milliarde Jahren getrennt, die Trennung von Pilzen und Pflanzen liegt aber mehr als 2 Milliarden Jahre zurück (Judd et al., 2002). Die besondere systematische Stellung der Pilze ist im so genannten „Tree of life“ erkennbar, der mit molekulargenetischen Methoden erstellt wurde (Hillis & Holder, 2000; Pennisi, 2003). Aus diesem „Stammbaum des Lebens“ ist in [Abb.1](#) der Bereich der *Mycophyta* dargestellt. In dieser Darstellung grenzen die Pilze links an die Tiere und rechts an die *Archaea* und die Bakterien. Die Gattung *Candida* ist genetisch nicht einheitlich definiert, denn neben dem Hauptast (Stern in [Abb.1](#)) tauchen Vertreter dieser Gattung auch in zwei anderen Zweigen des Stammbaums auf (Kreise in [Abb. 1](#)). Die nächsten Verwandten von *C. albicans* sind - mit zunehmendem molekularem Abstand - die *Candida*-Arten *dubliniensis*, *maltosa*, *visvanathii*, *lodderae*, *tropicalis* und *sojiae*.

Es gibt pathogene und nichtpathogene *Candida*-Arten. Zu letzteren gehören z. B. *C. mycoderma*, die auf sauren Gurken eine graue Kahmhaut bildet und *C. reukaufii*, die im Nektar verschiedener Blütenpflanzen wächst (Schubert et al., 1990). *C. kefyr*

vergärt Milchzucker und diente schon in traditionellen Gesellschaften Asiens der Herstellung von Kefir.

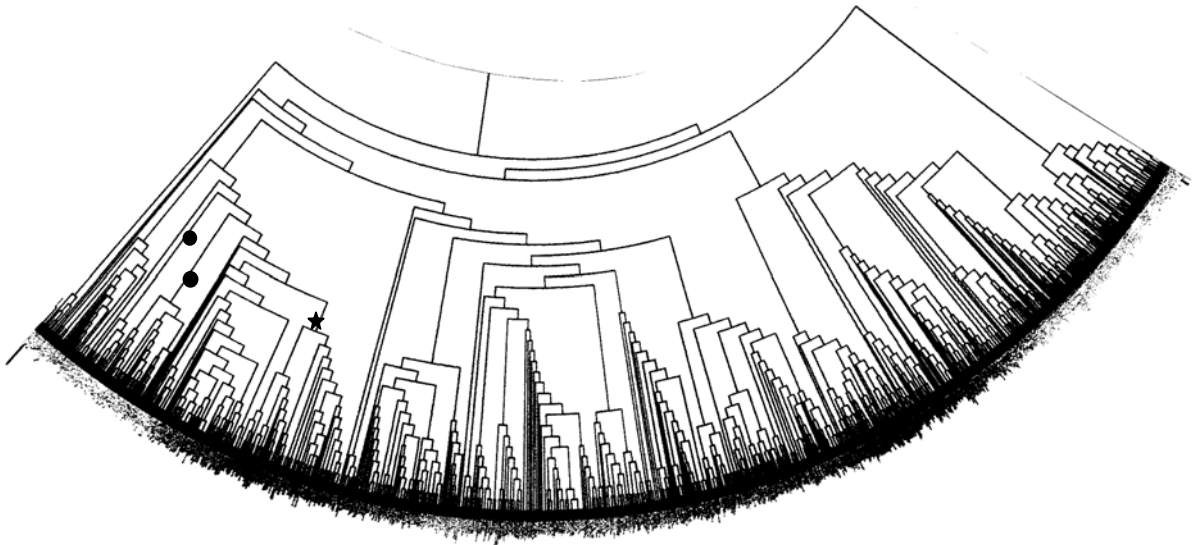


Abb. 1:

Die Abteilung der Pilze im molekularen „Stammbaum des Lebens“ (David M. Hillis, Austin; <http://www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/Download.html>).

1.1.2 Medizinische Bedeutung

Candida albicans ist ein „opportunistisch pathogener“ Organismus. Als harmloser Kommensale lebt er auf der Mund- und Darmschleimhaut von etwa 15 – 60 % aller gesunden Menschen (Odds et al., 2001) und verursacht hierbei keine Symptome. Erst wenn der Wirtsorganismus immunologisch geschwächt ist, kommt es zum großflächigen Befall von Haut und Schleimhäuten und zu einem Befall der inneren Organe bis hin zu einer tödlichen Sepsis. Hauptsächlich von dieser Candidose betroffen sind HIV-Infizierte und Tumorpatienten unter Chemotherapie.

Eine häufige klinische Manifestation im Kindesalter ist die pseudomembranöse orale Candidose, der Soor, der bei 2 - 5 % aller normalen Neugeborenen am 7. bis 10. Lebensjahr auftritt. Nach dem 1. Lebensjahr ist der orale Soor vor allem Folge einer peroralen Antibiotikabehandlung. Die häufigste Candida-Infektion des Kindesalters ist die Windeldermatitis (Weisse et al., 1996).

Gegenwärtig sind Candida-Infektionen zu 52 - 63 % durch *C. albicans* verursacht (Klepser et al., 1997). Wichtige pathogene Keime sind daneben auch *C. tropicalis*,

glabrata, *parapsilosis*, *guilliermondii*, *lusitaniae*, *pseudotropicalis* und *krusei* (Ansorg, 1998). Für die praxisnahe Identifizierung dieser unterschiedlichen Spezies steht eine Reihe von kommerziellen Testsystemen mit unterschiedlicher diagnostischer Wertigkeit zur Verfügung (Fuchs, 2000).

1.1.3 Pathogenese der Candidosen

Die meisten Stämme von *C. albicans* haben 8 Chromosomenpaare und sind diploid (Soll et al., 1993). Das haploide Genom umfasst etwa 16 Millionen Basenpaare (Mb) und enthält etwa 7000 Gene (Berman & Sudbery, 2002; Bruno & Mitchell, 2004). Auf dem Chromosom 5 liegen die Gene für die Konjugationsfaktoren („mating factors“) a und α . Sie sind das Merkmal einer geschlechtlichen Differenzierung und ermöglichen z. B. bei der haploiden Form von *Saccharomyces cerevisiae* eine Paarung von a - und α - Zellen zur diploiden Form der Hefe mit nachfolgender Reduktionsteilung (Meiose), genetischem Austausch und Bildung der wiederum haploiden Ascosporen. Dieser Zyklus gestattet es dem Hefe-Genetiker, die Gene im Genom der Hefe zu lokalisieren und zu identifizieren. Wenn Hefen diploid und a/α -heterozygot sind, ist eine Paarung nicht möglich. Da dies ganz überwiegend die Konstitution von *C. albicans* ist, kann unter normalen Laborbedingungen eine Sexualität dieses Organismus nicht beobachtet werden (Johnson, 2003). Deshalb war bisher eine gezielte Inaktivierung von Kandidatengenen notwendig, um Virulenzfaktoren zu identifizieren.

Der Begriff „Virulenzfaktor“ wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich definiert (Haynes, 2001). Eine umfassende Definition schließt alle die Gene ein, deren Inaktivierung im Tierversuch zu verminderter Virulenz führt (Navarro-Garcia et al., 2001). Engere Definitionen zielen auf Faktoren von voll vitalen Hefen, die entweder direkt mit den Wirtszellen interagieren (Odds et al., 2001), oder diese wirklich schädigen (Casadevall & Pirofski, 1999). Unabhängig von diesen Definitionen ist es therapeutisch und prophylaktisch wichtig, die Mechanismen kennen zu lernen, die es einem opportunistischem Keim wie *Candida* erlauben, pathogen zu werden (Augsten et al., 2002). Bisher bekannte morphogenetische und molekulare Mechanismen der Pathogenese von *Candida*-Infektionen sind in Abb. 2 zusammengefasst.

Der so genannte phänotypische „Switch“, der Wechsel von der häufigen weißen zur seltenen opaken Wachstumsform und zurück, erlaubt der Hefe eine Anpassung an

die jeweiligen Bedingungen im Wirt. Im Maus-Modell ist die weiße Form besonders virulent bei systemischen Infektionen und die opaque bei Infektionen der Haut. Dadurch dass die opaquen Formen auf bisher nicht bekannte Weise homozygot für die Konjugationsfaktor-Gene auf Chromosom 5 werden, sind sie zur Paarung mit Bildung von zunächst tetraploiden Zellen befähigt (Berman & Sudbery, 2002; Soll, 2004). Zellen aus frischen klinischen Isolaten „switchen“ besonders häufig.

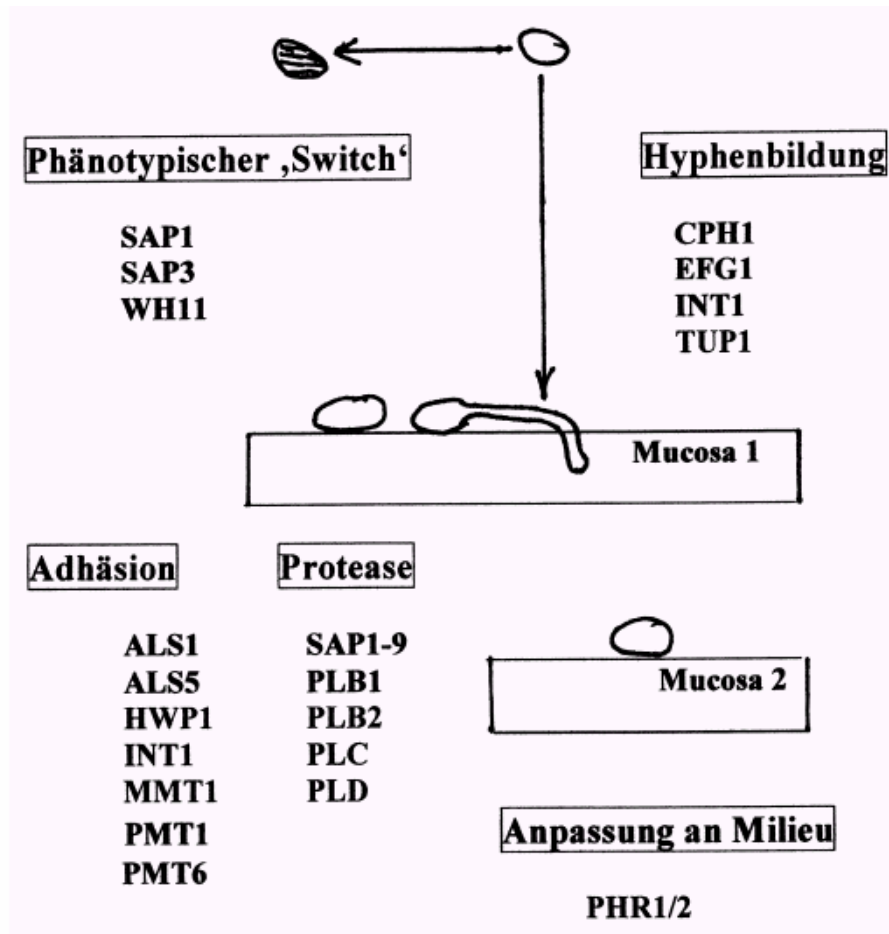


Abb.2:

Molekulare Mechanismen der Pathogenese von *Candida*-Infektionen
(aus Yang (2003), umgezeichnet)

Nach der Adhäsion der Hefezelle an die Wirtszelle kommt es zur Bildung von Hyphen, ein Prozess, der als „Morphogenese“ bezeichnet wird. Dies ist möglicherweise der wichtigste Pathogenitätsfaktor, da *Candida*-Stämme mit besonders starker Hyphenbildung auch besonders pathogen sind (Saltarelli et al., 1975) und weil Mutanten, die in flüssigen Medien keine Hyphen bilden können, nicht pathogen sind (Lo et al., 1997; Schröter et al., 2000; Augsten et al., 2002).

Mit der Sezernierung von Proteasen (nur durch opaque Zellen) wird die Invasion der Hefe eingeleitet.

Die Anpassung der Hefe an ihr Milieu wird durch zwei Glycosidase-Gene gesteuert: PHR1 („pH response 1“) ist bei neutralem pH - im Blut und Gewebe - aktiv, PHR2 im sauren Milieu der Vagina.

Die Adhäsion der Hefe an die Epithelienoberfläche wird u. a. von dem Gen für das Zellwandprotein HWP1 und von dem Integrin-Gen INT1 gesteuert. Das HWP1-Protein wird durch eine Transglutaminase des Wirtes kovalent an die Epitheloberfläche gebunden.

Das INT1-Gen ist auch an der Hyphenbildung beteiligt. Die drei anderen Gene für Hyphenbildung (Morphogenese) sind Transkriptionsfaktoren mit bisher nur teilweise bekannten Zielgenen. TUP1 ist u. a. ein negativer Regulator von HWP1 (Haynes, 2001). An der Hyphenbildung ist auch ein Gen beteiligt, dessen Homologes beim Menschen das Wiskott-Aldrich-Syndrom (eine erbliche Krankheit mit Gerinnungsstörungen und Immundefekt) verursacht und das normalerweise eine Rolle bei der Reorganisation des Actin-Zytoskeletts spielt (Walther & Wendland, 2004). Interessant ist die Rolle der Aspartylproteasen, die von 9 Genen kodiert werden, SAP 1-9 (Navarro-Garcia et al., 2001; Yang, 2003). Die Gene SAP2, 4, 5 und 6 sind bei oraler Candidose und bei asymptomatischen Trägern aktiv. SAP1 und SAP3 werden spezifisch in opaquen Zellen und nur bei oraler Candidose exprimiert (Yang, 2003).

1.1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Schutz- und Virulenzfaktoren von *Candida albicans*

In der Atemkette wird der Sauerstoff der Luft zu Wasser reduziert. Wenn diese Reduktion unvollständig bleibt, entsteht zuerst das Superoxid-Anion-Radikal $O_2^{\cdot-}$ als Vorstufe weiterer reaktiver Sauerstoffspezies. Zu diesen zählen z. B. auch das Wasserstoffperoxid H_2O_2 , das Hydroxyl-Anion-Radikal $OH^{\cdot-}$ und der Singulett-Sauerstoff 1O_2 . Die zelluläre Konzentration der ROS ist insgesamt gering. Da sie aber leicht mit Komponenten der Zelle, z. B. den mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Zellmembran reagieren, wirken sie zytotoxisch. Superoxid-Dismutase und Katalase wandeln die ROS in Wasser um (Voet et al., 1999). Beide Enzyme haben also eine zytoprotektive Funktion.

Diese „zufällige“ Entstehung von ROS in der Atemkette spielt pathophysiologisch eine Rolle vor allem beim Altern. Hiervon biochemisch verschieden ist die Bildung von ROS in den Phagozyten, die mit einer Aktivierung der NADPH-Oxidase und einer „Atmungs-Explosion“ (respiratory burst) beginnt (Badwey & Karnovsky, 1980). Da die Hefe von den neutrophilen Granulozyten des Wirtes im Sinne eines oxidativen fungiziden Mechanismus mit ROS „angegriffen“ wird, ist für *Candida* das Vorhandensein von Katalase als antioxidativer Abwehrmechanismus im Wirtsorganismus überlebenswichtig. Entsprechend wurde die Virulenz von *C. albicans* nach Disruption aller Kopien des Katalase-Gens im Mausmodell eingeschränkt gefunden (Wysong et al., 1998). Umstritten ist noch, ob auch das fungizide Peptid Histatin 5 aus menschlichem Speichel über die Bildung von ROS wirkt (Helmerhorst et al., 2001; Veerman et al., 2004).

Candida albicans muss sich nicht nur gegen die Wirkung von ROS aus Wirtszellen schützen, sondern produziert selbst auch ROS als potenzielle Virulenzfaktoren. Die Produktion von H_2O_2 durch *Candida* wurde mit verschiedenen Nachweismethoden zuerst 1981 für *C. mycoderma* (Eremina & Lozinov; 1981) und 1983 für *C. albicans* (Danley et al., 1983) beschrieben. Während die Atmung der Blastosporen, gemessen an der Produktion von $^{14}CO_2$ aus 1- ^{14}C -Glukose, bis zu einer Zellzahl von 10^7 kontinuierlich zunahm, war die Bildung von H_2O_2 schon mit 10^6 Zellen am höchsten. Die Autoren (Danley et al., 1983) deuten dies als Schutzmechanismus der Hefe vor dem eigenen Zellgift.

Der enge Zusammenhang der Morphogenese von *C. albicans* mit der ROS-Bildung wurde erstmals von Schröter (1999) und Schröter et al. (2000) beschrieben. Mit zwei unabhängigen Nachweismethoden für ROS (Reduktion von Cytochrom c und lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz) wurde eine Zunahme von deren Produktion vom Blastosporenstadium über die Phase der Keimschläuche bis zur Hyphenphase gesehen. Aoki et al. (2002) in Japan bestätigten diese Befunde mit einer unabhängigen Messmethode. Eine weitere experimentelle Studie unserer Arbeitsgruppe in Jena (Sander et al., 2002) ergab Hinweise, dass das Antimykotikum Terbinafin (Lamisil®, Novartis) nicht nur über eine Hemmung der Squalen-Epoxidase wirkt, sondern evtl. auch über eine Hemmung der ROS-Synthese. Da Terbinafin ein Radikal-„Scavenger“ ist, mit Radikalen also direkt in eine chemische Wechselwirkung tritt (Camera et al., 1999), war eine unmittelbare Unterdrückung der ROS zu erwarten

gewesen. Es wurde jedoch darüber hinaus auch eine Zeitabhängigkeit für die Verminderung der ROS gefunden, wie sie für biochemische Reaktionen, in diesem Fall eine Hemmung der ROS-Synthese, charakteristisch ist.

Bei einer vergleichenden Analyse von etwa 900 Proteinen aus *C. albicans*-Blastosporen und -Hyphen wurde eine Zunahme der oxidierten inaktiven Form des Thiol-spezifischen Antioxidans-Proteins TSA1 gefunden (Choi et al., 2003). Dies unterstützt die Beobachtung einer vermehrten ROS-Bildung in den Hyphen. Ob das TSA1-Protein auch die ROS der Phagozyten inaktiviert, ist noch nicht geklärt.

1.2 Die Blaualge *Spirulina platensis*

1.2.1 Systematische Stellung

Blaualgen (Blau-Grün-Algen, *Cyanophyta*) gehören mit den Algen (*Phycophyta*), Flechten (*Lichenophyta*) und Moosen (*Bryophyta*) zur Gruppe der so genannten Niederen Pflanzen (Schubert et al., 1990). Wie die Bakterien, mit denen sie seit etwa 3,5 Milliarden Jahren die Erde besiedeln, haben Blaualgen keinen echten Zellkern. Sie sind Prokaryote, haben aber bis zu 10-fach größere Zellen als die Bakterien. Deshalb werden sie in der Literatur gelegentlich auch als „Mikroalgen“ bezeichnet. Die Chloroplasten der grünen Pflanzen und der Rotalgen leiten sich von Cyanophyten her, die vor mehr als 1 Milliarde Jahren mit deren gemeinsamen Vorfahren eine Endosymbiose eingingen (Judd et al., 2002).

Die Blaualgen-Gattung *Spirulina* mit gedrehten Trichomen (fadenförmigen Zellverbänden) gehört zur Familie der *Oscillatoriaceae* mit einreihigen Trichomen, und diese zur trichombildenden Ordnung der *Nostocales* (*Oscillatoriales*, *Hormogonales*) in der Klasse der *Hormogoniophyceae*. Durch den Besitz von Chlorophyll a und den lichtabsorbierenden Begleitpigmenten C-Phycocyanin, C-Phycoerythrin und Allophycocyanin sind die Mitglieder dieser Klasse zur Photosynthese befähigt. Sie gehören schließlich zur Abteilung der *Cyanophyceae*, denen im Gegensatz zu den übrigen Algen (neben einem echten Zellkern) auch Chromatophoren (Träger der Assimilationsfarbstoffe) fehlen (Wartenberg, 1979; Schubert et al., 1990).

In Deutschland häufige Arten von *Spirulina* sind u. a. *Sp. subsalsa* und *Sp. major*. Sie werden sowohl in Süßwasser als auch in der Ostsee gefunden, wo sie als Plankton oder auf Steinen und im Schlamm leben (Schubert et al., 1990).

1.2.2 Biochemie und Sekundär-Metabolite

Cyanophyten haben eine Genomgröße von etwa 3600 Kilobasen (kb) mit etwa 3200 Genen (Herdman et al., 1979; Judd et al., 2002). Im Vergleich hierzu ergab die Totalsequenzierung für *Escherichia coli* K12 eine Genomgröße von 4639 kb (Blattner et al., 1997) mit vorläufig etwa 4400 Genen (Sensen, 2002).

Neben den genannten lichtabsorbierenden Pigmenten aus der Klasse der Phycobiliproteine besitzen Cyanophyten als akzessorische Pigmente auch Carotinoide (Palla & Busson, 1969; Frohne & Jensen, 1998). Einige Cyanophyten bilden toxische Peptide und Alkaloide („Algenblüte“). Andere Sekundär-Metabolite sind antibiotisch wirksame Bromphenole sowie fungizide, algizide und kanzerostatische Verbindungen (Frohne & Jensen, 1998).

Diese Vielzahl von z. T. bisher unbekanntem Naturprodukten auch in anderen marinen Cyanobakterien, hat zu einer intensiven Suche nach medizinisch wirksamen Substanzen geführt. So wurden ca. 10 % von 424 Verbindungen als antimykotisch wirksam gefunden (Burja et al., 2001).

1.2.3 Verwendung von *Spirulina platensis*

1.2.3.1 ¹³CO₂-Atemtest

Wenn *Spirulina*-Kulturen in Gegenwart von Aminosäure-Vorstufen wachsen, die das stabile, d. h. nicht-radioaktive Kohlenstoff-Isotop ¹³C enthalten, dann kann mit solchen Algenpräparaten ein preisgünstiger, verlässlicher, genauer und laborferner CO₂-Atemtest zur Bestimmung der Entleerungszeit des Magens des Menschen durchgeführt werden (Lee et al., 2000; DiBaise et al., 2001; Viramontes et al., 2001). Dieser Test ist eine Alternative zur sonst überwiegenden Verwendung der ¹³C-Caprylsäure (C₈H₁₆O₂) im ¹³CO₂-Atemtest.

1.2.3.2 Health Food

Ein natürliches Vorkommen von *Spirulina platensis* sind die alkalischen Seen nordöstlich des Tschadsees. Dort wächst sie mattenförmig auf der Wasseroberfläche. Die einheimische Bevölkerung trocknet diese Matten in Form von Biskuits, Dihé genannt, und bereitet daraus Saucen zum Hirsebrei (Ciferri, 1983). Wegen der großen Nachfrage in westlichen Ländern wird *Spirulina platensis* heute großtechnisch z. B. in Israel und in Asien (Lee, 1997) kultiviert.

Die Internet-Suchmaschine Google ergibt gegenwärtig für das Suchwort „Spirulina“ auf Seiten aus Deutschland ca. 244.000, im gesamten Web etwa 1,2 Millionen Hinweise. Ein Beispiel für den Vertrieb von Spirulina-Präparaten ist die Versandfirma Paul (<http://www.paul-direktversand.de>) mit ihrem Angebot von 500 mg Earthrise® Spirulina-Tabletten, von denen sechs am Tag (z. Zt. 0,11 € pro Stück aus der Großpackung) für Erwachsene den Tagesbedarf (DGE) von Eisen zu 20 %, von Provitamin A zu 40 %, und an Vitamin B₁₂ zu 100 % decken. Es sei aber darauf hingewiesen, dass die Angaben widersprüchlich sind. In einer japanischen Publikation wird berichtet, dass nach spektroskopischen und funktionellen Kriterien nur 17 % des nominellen Vitamin B₁₂ aktives B₁₂ war. Die übrigen 83 % wurden als Pseudo-Vitamin B₁₂ klassifiziert (Watanabe et al., 1999).

Aus den zahlreichen Studien über positive medizinische Wirkungen von *Spirulina* - Präparaten und -Inhaltsstoffen sind vor allem der Befund einer klassenspezifischen Stimulation der Antikörper-Produktion von Mäusen (Hayashi et al., 1998), eine Vielzahl von Mitteilungen über deren mögliche Verwendung zur Prophylaxe von Malignomen (z. B. Schwartz et al., 1988; Mathew et al., 1995; Dasgupta et al., 2001) und eine Arbeit über die Wirkung von C-Phycocyanin (s. weiter unten) als selektiver Inhibitor der Cyclooxygenase-2 (Reddy et al., 2000) zu nennen. Es fehlen aber weiterhin kontrollierte Studien am Menschen über den Wert von *Spirulina* als Nahrungs-Ergänzungsmittel (Chamorro et al., 2002; MedLine, März 2004).

Auf dem deutschen Buchmarkt sind mehrere nicht-wissenschaftliche Abhandlungen erschienen, die dem Publikum *Spirulina* als „blaugrünen Lichtträger“ (Meyer, 1999), als „blaugrünes Wunder“ (Meyer, 2000), als „Wundernahrung der Zukunft“ (Meyer, 2002), als „Supernahrung für Körper und Geist“ (Salvesen, 2003) und als "Wunderalge" („Essen Sie Leben“) (Felte, 2002) empfehlen.

Zur Zeit der spanischen Eroberung von Mexiko verarbeiteten die Azteken in Tenochtitlán *Spirulina maxima* (Tecuitlatl) zu Brot und gekochten Speisen. Die spanischen Missionare verglichen damals den Geruch der Speise mit Käse (Ciferri, 1983). Dieses Problem bestand auch noch 1975, als eine Fragebogen-Aktion in Frankreich ergab, dass dort proteinreiche Nahrungsprodukte mit Zusatz von *Spirulina* wegen der unschönen Farbe und wegen des aufdringlichen Geruchs und Geschmacks wenig geschätzt wurden (Sautier & Tremolieres, 1975).

Zwei Arbeiten berichten über negative Folgen des Verzehrs von *Spirulina*. Ein 52 Jahre alter Japaner erlitt nach Beginn der Einnahme von *Spirulina* einen toxischen Leberschaden, der sich nach Absetzen zurückbildete. Ob es sich um eine primäre Schädigung oder eher um eine Interaktion mit Simvastatin oder Amlodipine handelte (beides Medikamente, die der Patient zur gleichen Zeit einnahm und dann zusammen mit *Spirulina* absetzte), blieb ungeklärt (Iwasa et al., 2002). Die andere Arbeit berichtet über Exazerbationen eines Pemphigus vulgaris und die Auslösung einer Dermatomyositis als unerwünschte Nebenwirkungen der Immunstimulation durch *Echinacea*, *Spirulina* und „AFA-Algen“ (Lee & Werth, 2004).

AFA-Algen werden wie *Spirulina* als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet (Simonsohn, 2000; Arndt, 2003). Es sind dies Präparate aus der Blau-Grün-Alge *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) RALFS, der „Wasserblüte“. Sie gehört zur Familie der *Nostacaceae* in der Ordnung der *Nostocales* und ist die häufigste Art im Plankton der deutschen Süßgewässer und der Ostsee (Schubert et al., 1990). In Kanada vermarktete AFA-Präparate enthielten hepato- und neurotoxische Mikrocystine - zyklische Heptapeptide - z. T. oberhalb des erlaubten Grenzwertes (Lawrence et al., 2001). Die kanadische Gesundheitsbehörde „Health Canada“ (<http://www.hc-sc.gc.ca>) hat deshalb empfohlen, dass Kinder ganz auf diese Präparate verzichten sollen.

Das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin in Berlin (BgVV) hat im gleichen Sinne in seiner Stellungnahme zu AFA-Algen vom 23. 09. 2001 angemerkt, „dass eine gesundheitliche Unbedenklichkeit des Verzehrs von Algengerzeugnissen nach dem jetzigen Stand der Kenntnis nicht garantiert ist“. Auch medizinische Therapien des häufigen Syndroms der Aufmerksamkeitsstörung mit Hyperaktivität (ADHD) können nicht durch AFA-Präparate ersetzt werden (Rossi & Winkler, 2002).

1.2.4 Analyse der antioxidativen Wirkung von *Spirulina platensis*

Protein-Extrakte von *Spirulina platensis* inaktivieren effizient Hydroxyl- und Peroxyl-Radikale. Eines der häufigsten *Spirulina*-Proteine ist C-Phycocyanin, ein wasserlösliches, lichtsammelndes Phycobiliprotein aus den Photosynthesemembranen der Blaualge. Bei der Reinigung dieses Proteins wird das radikal hemmende Prinzip parallel mit angereichert (Pintero Estrada et al., 2001). Da chemisch reduziertes Phycocyanin seine Farbe von gelbgrün zu tief blau ändert, wenn es *in vitro* die Lipid-Peroxidation von Mikrosomen hemmt, wird das kovalent gebundene Chromophor Phycocyanobilin (Abb. 3) als eigentliche Wirksubstanz vermutet. *In vivo* unterdrückt die Vorbehandlung von Ratten mit dem Protein die hepatotoxische Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff (Bhat & Madyastha, 2000).

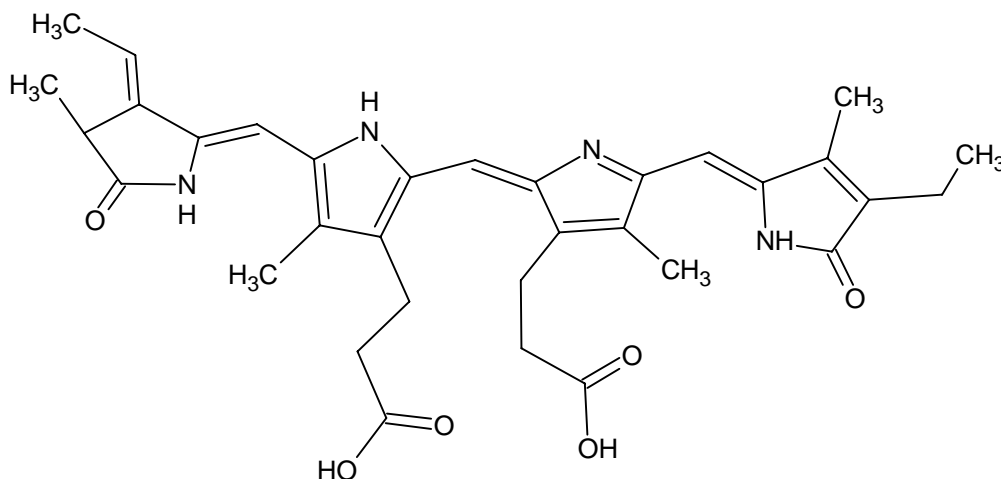


Abb. 3:

Struktur des Phycocyanobilins, des Chromophors von C-Phycocyanin. (nach S. D. Kunk)

Auch in anderen Tiermodellen hat sich Phycocyanin als entzündungshemmend erwiesen, z. B. im durch Arachidonsäure induzierten Ohrödem der Maus (Romay et al., 2000), im allergischen Ohrödem der Maus (Remirez et al., 2002b) und in der mit Zymosan induzierten Arthritis der Maus (Remirez et al., 2002a). Mit luminolverstärkter Chemilumineszenz wurde gezeigt, dass C-Phycocyanin vor allem auf Hydroxyl- und Peroxylradikale wirkt (Romay et al., 1998).

1.3 Die Interaktion von *Spirulina platensis* und *Candida albicans*

Im Bemühen, die vielfach behaupteten gesundheitsfördernden Wirkungen von *Spirulina*-Nahrungsmittelzusätzen experimentell zu untermauern, haben Gorobets et al. (2001) durch Kokultivierung von pathogenen Keimen mit Biomasse und/oder Kultur-Lyophilisat von *Spirulina platensis* Interaktionen im Sinne einer Hemmung des Wachstums der pathogenen Keime gegenüber Kontrollen ohne Zusatz der *Spirulina*-Produkte untersucht. In der Studie wurden die folgenden Keime verwendet: *E.coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium xerosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*. *Candida albicans* wurde nur mit Biomasse getestet. Die Autoren verwendeten den folgenden Versuchsansatz: Kultur auf 1,5 % Minimalagar, pro ml Agar Zusatz von 0,01; 0,1; 1,0 und 10 mg (Endkonzentration) autoklavierte Biomasse bzw. Lyophilisat. Messwert war die Zahl der Kolonien auf der Oberfläche („Koloniebildende Einheiten pro mL“).

Tab. 1:

Hemmung des Wachstums von *Candida albicans* durch *Spirulina*-Trockenmasse (Gorobets et al., 2001)

(1) Kontrolle	4,4 ± 0,66 (3,86 – 5,06)		
(2) 0,01 mg/mL	0,84 ± 0,13 (0,71 – 0,97)	p (2 gg. 1) < 0,05	
(3) 0,1 mg/mL	0,73 ± 0,12 (0,61 – 0,85)	p (3 gg. 1) < 0,05	p (3 gg. 2) n.s.
(4) 1 mg/mL	0,45 ± 0,07 (0,38 – 0,58)	p (4 gg. 1) < 0,05	p (4 gg. 3) < 0,05
(5) 10 mg/mL	0,50 ± 0,08 (0,42 – 0,58)	p (5 gg. 1) < 0,05	p (5 gg. 4) n.s.

n.s.: nicht signifikant ($p > 0.05$), gg.: gegen

Mit Ausnahme von *S. typhimurium*, *S. pyogenes* und *S. aureus* wurde das Wachstum von allen untersuchten Mikroorganismen durch *Spirulina*-Biomasse gehemmt, ohne dass jedoch immer eine klare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung erkennbar war. Die für *C. albicans* erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefasst. Es ist dies eine von nur drei für das Thema relevanten Publikationen, die mit einer Medline-Recherche „spirulina AND candida“ erhalten wurden.

Die zweite Arbeit, aus der gleichen russischen Arbeitsgruppe, betrifft eine mit nur wenigen Zitaten ausgestattete Literaturübersicht über die biologischen Aktivitäten von *Spirulina platensis* (Blinkova et al., 2001). In der dritten Publikation schließlich zeigen Autoren aus Izmir (Özdemir et al., 2004), dass an der Hemmung des Wachstums von *Candida albicans* ATCC 10239 durch *Spirulina platensis* Inhaltsstoffe der Mikroalge beteiligt sind, die mit Methanol extrahiert werden können.

2. Ziel der Arbeit

Candida albicans muss sich nicht nur gegen die Wirkung von ROS aus Wirtszellen schützen, sondern produziert selbst auch ROS (Schröter et al., 2000; Aoki et al., 2002; Sander et al., 2002). Da die Hyphenbildung (Morphogenese) in engem Zusammenhang nicht nur mit der Pathogenität sondern auch mit der ROS-Bildung steht, wurde erstmals von Schröter (1999) und Schröter et al. (2000) - aus der gleichen Arbeitsgruppe wie die vorliegende Arbeit - vermutet, dass die ROS für *Candida albicans* eine Rolle als Virulenzfaktor spielen könnten.

Diese Vermutung wurde durch den Befund unterstützt, dass das Antimykotikum Terbinafin (Lamisil®, Novartis) die ROS-Produktion von *Candida albicans* nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig hemmt (Sander et al., 2002).

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, einen weiteren Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, ob die von *Candida* produzierten ROS als potenzielle Virulenzfaktoren anzusehen sind.

Fußend auf den Befunden von Gorobets et al. (2001), dass *Spirulina* das Wachstum von *Candida* hemmt, sollte mit lucigenin-verstärkter Chemolumineszenz untersucht werden, ob eine wässrige Suspension von *Spirulina*-Biomasse die ROS-Bildung der pathogenen *Candida albicans*-Stämme 3153A und CA6 dosis- und evtl. auch zeitabhängig hemmt. Ob also der wachstumshemmende Einfluss von *Spirulina* teilweise auch über ein direktes ROS-„Scavenging“ und/oder eine biochemische Hemmung der ROS-Produktion vermittelt wird. Im positiven Fall könnten sich möglicherweise Konsequenzen für eine therapeutische Beeinflussung von Mykosen mit *Spirulina*-Präparaten ergeben.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Ascorbinsäure	Fa. Sigma, Taufkirchen
Casyclean®-Lösung (Reinigungslösung)	Fa. Schärfe-System, Reutlingen
Casyton®-Lösung (Isotonische Salzlösung)	Fa. Schärfe-System, Reutlingen
Dextrose/Glukose	Fa. Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (getestet auf Mycoplasmen)	Fa. Gibco, Eggenstein
Hefe-Extrakt	Fa. Difco, Detroit
Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium-dinitrat)	Fa. Fluka, Buchs
PBS (Phosphate Buffered Saline) Tabletten (1Tbl. für 200 mL Aqua dest., pH=7,4)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Peptisches Pepton aus Blut	Fa. Berlin-Chemie, Berlin
Sabouraud - 4%-Glukose-Agar	Fa. BAG, Lich
<i>Spirulina platensis</i> -IGV Biomasse	Fa. IGV, Bergholz-Rehbrücke

3.2 *Candida albicans*

3.2.1 Stämme und Kulturbedingungen

Es wurden die *Candida albicans*-Stämme 3153A und CA6 verwendet. Der häufig für *in vitro*-Untersuchungen verwendete Stamm 3153A stammt ursprünglich aus dem mykologischen Referenzlabor London. Der Stamm CA6 ist ein Wildstamm. Sowohl der Stamm 3153A als auch der Stamm CA6 zeichnen sich durch eine hohe Induktivität der Hyphenbildung aus und waren daher besonders für die beabsichtigten Untersuchungen an Hyphen geeignet. Beide Stämme sind hoch pathogen.

Die Kulturbedingungen waren für beide Stämme gleich. Sie wurden bei 28°C auf Sabouraud-Glukose-Agar für 24 Stunden kultiviert.

Für die Herstellung der so genannten Vorkulturen wurden von diesen Pilznährböden für die weiteren Untersuchungen 1 - 2 Einzelkolonien in 50 mL YEPD-Medium inokuliert und bei 25°C als Flüssigkultur, schüttelnd, über 6, 11 oder 24 Stunden inkubiert. Das für diese Vorkulturen benutzte und aus seinen Komponenten im Labor angesetzte Nährmedium YEPD enthält pro Liter destilliertem Wasser 10 g Hefeextrakt (YE), 20 g peptisches Pepton (P) und 10 g Glukose/Dextrose (D). Vor der Verwendung wurde es für 20 min bei 121°C autoklaviert.

3.2.2 Hypheninduktion

Um Hyphenbildung zu erreichen, wurden aus den Flüssigkulturen (11 oder 24 Stunden Kulturdauer) jeweils 500 µL entnommen und zu 90 mL frischem YEPD-Medium + 10 mL fetalen Kälberserum gegeben. Es wurden drei Ansätze hergestellt. Der erste wurde direkt weiter verarbeitet, die beiden anderen für eine halbe bzw. ganze Stunde im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Der Ablauf der morphologischen Veränderungen in den Ansätzen wurden bei jedem Versuch mikroskopisch untersucht und an jeweils 100 Zellen beurteilt. Sowohl beim Stamm 3153A als auch beim Stamm CA6 kam es unter diesen Bedingungen in den inkubierten Ansätzen zur Hyphenbildung.

3.3 Messungen von Zellzahl und -volumen

Zellzahl- und Volumenmessungen der Zellen aus den Flüssigkulturen wurden mit Hilfe des Casy® Cell Counter Modell TT (Schärfe-System, Reutlingen) durchgeführt. Dazu wurden die zu messenden Pilz-Suspensionen mit Casyton®-Lösung (steril filtriert) 1:500 oder 1:10.000 verdünnt. Die Methode erfasst Zellen mit einem Zelldurchmesser im Bereich von 2,25 – 15,00 µm. Der Durchmesser der Messkapillare betrug 60 µm. Aus jeder Probe wurde 3-mal ein Volumen von 400 µL zur Messung gebracht und deren Mittelwert berechnet (Abb. 4).

Um Aussagen über die zeitliche Entwicklung der Zellzahl treffen zu können, wurden Wachstumskurven für den Stamm 3153A erstellt. So konnten die Phasen des Wachstums identifiziert werden. Abb. 5 zeigt ein allgemeines Schema der verschiedenen Wachstumsphasen.

```

CASY1 MODEL TT CAP: 60 µm   COMMENT.....
RANGE: 02.25 TO 15.00 µm   DILUTION      : 500
COUNTS/ml      :6.784E06  SAMPLE       : 3x400 u1
COUNTS >15 µm : 228      VOLUME (TOTAL):2.847E06 f1
DIAMETER (MAX)  : 4.27 µm  VOLUME (MAX)  :4.076E01 f1
DIAMETER (MEAN) : 6.16 µm  VOLUME (MEAN) :1.748E02 f1
  
```

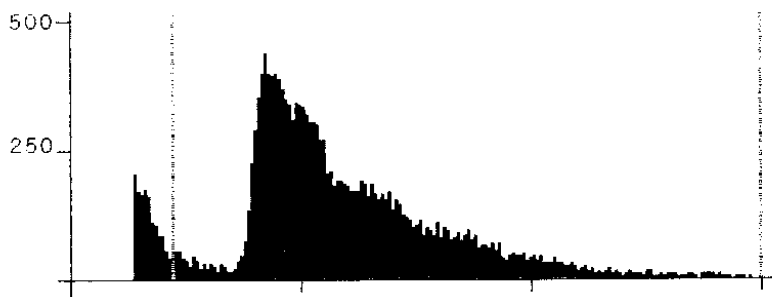


Abb.4:

Datenausgabe des Casy® Cell Counter: Gezeigt ist die Messung der Zellzahl einer 24 h Kultur des Stammes 3153A. X-Achse: Zellgröße in µm, Y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen pro mL. Das Zellvolumen wird in fL angegeben.

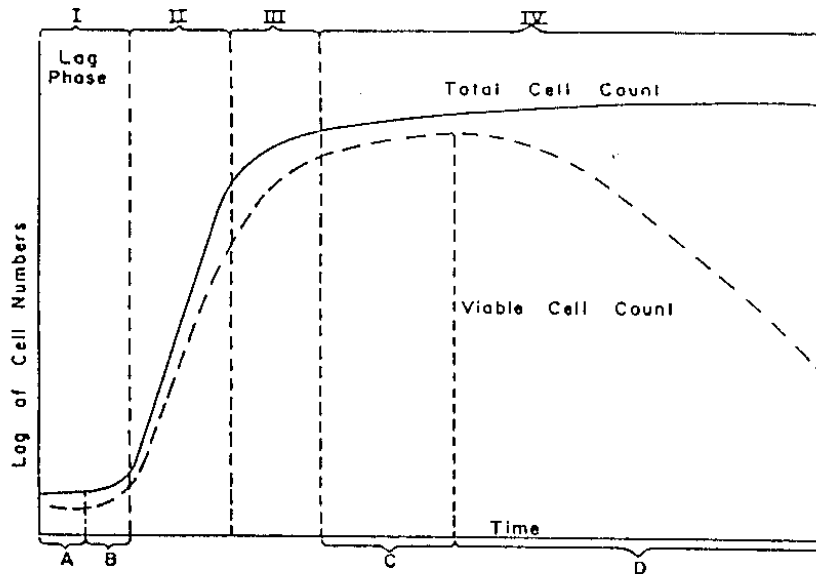


Abb. 5:

Wachstumskurve von Hefen mit den verschiedenen Phasen des Wachstums und dem Unterschied zwischen totaler Zellzahl und Anzahl der lebenden Zellen (aus Cook, 1958).
I: Lag-Phase **II:** Exponentielle Wachstumsphase **III:** Periode der negativen Akzeleration
IV: Stationäre Phase. **A:** Periode der Adaptation **B:** Periode der Erholung **C:** Echte Stationäre Phase **D:** Phase der Abnahme

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden Flüssigkulturen des Stammes über 24 Stunden beobachtet und zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 11 und 24 Stunden die Zellzahlen bestimmt.

3.4 Lucigeninverstärkte Chemilumineszenz

Für die Messung der Chemilumineszenz mit der Methode von Hipler et al. (1998, 1999) wurde das Röhrenluminometer LB 953 (Berthold, Wildbad, Deutschland) verwendet. Das LB 953 hat einen Standarddetektor, der Lichtemissionen im Spektralbereich von 390 bis 620 nm messen kann.

Für die Messungen stand eine Probenkette für 42 Proben zur Verfügung. Die Gesamtzeit der Chemilumineszenzmessung betrug für Messungen an Blastosporen 20 Minuten (42 Proben) und für Messungen an Hyphen 15 Minuten (30 Proben), wobei alle 1,9 Minuten eine 0,1 Sekunden dauernde Messung durchgeführt wurde. Es wurde die „Slow kinetic“-Methode von Hipler et al. (1998, 1999) benutzt.

Die Temperatur in der Messkammer betrug 37°C.

Von jedem Ansatz wurde ein Volumen von 200 µL je Probe in ein Röhrchen pipettiert und zu Beginn der Messung über eine Injektionspumpe 200 µL einer 0,0001 molaren Lucigenin-Lösung hinzugefügt. Die Lucigenin-Lösung wurde für jeden Versuch frisch hergestellt, das Lösungsmittel war steril filtriertes PBS.

Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurde pro Probenröhrchen die Summe aller cpm-Werte der Messzeitpunkte - abzüglich des Leerwerts von PBS - gebildet und für jeden Ansatz der Mittelwert aller zugehörigen Summen berechnet. Hierdurch war es auch teilweise möglich, die Kinetik der ROS-Bildung zu berücksichtigen, die durch einen steilen Anstieg und langsamen Abfall charakterisiert ist.

3.4.1 Messungen mit kombinierter Zellzahlbestimmung

Für die *C. albicans* Stämme 3153A und CA6 wurde einmalig eine Flüssigkultur über 24 Stunden beobachtet. Dabei wurde nach 0, 2, 4, 6, 10, 14, 20 und 24 Stunden die Zellzahl mit dem Casy® Cell Counter (Schärfe-System, Reutlingen) bestimmt und anschließend die ROS-Bildung der Pilze mit der Chemilumineszenzmessung quantifiziert. Dazu wurden pro Messzeitpunkt 30 Proben zur Messung gebracht.

3.4.2 Messungen an *Spirulina platensis*

Für die Chemilumineszenzmessungen mit *Spirulina platensis*-Zugabe wurden 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL und 10 mg/mL konzentrierte Suspensionen hergestellt, wobei als Lösungsmittel steril filtriertes PBS verwendet wurde.

Die Suspensionen wurden den Ansätzen mit Pilzsuspensionen zugesetzt und mit bzw. ohne Inkubationszeit im Röhrchenluminometer LB 953 (Berthold, Wildbad, Deutschland) gemessen.

3.4.3 Messungen an Blastosporen (Vorkulturdauer 6 h)

Für die Chemilumineszenzmessungen an Blastosporen vom Stamm 3153A mit einer Vorkulturdauer 6 Stunden wurden je 8 Proben pro Ansatz (Abb. 6) gemessen.

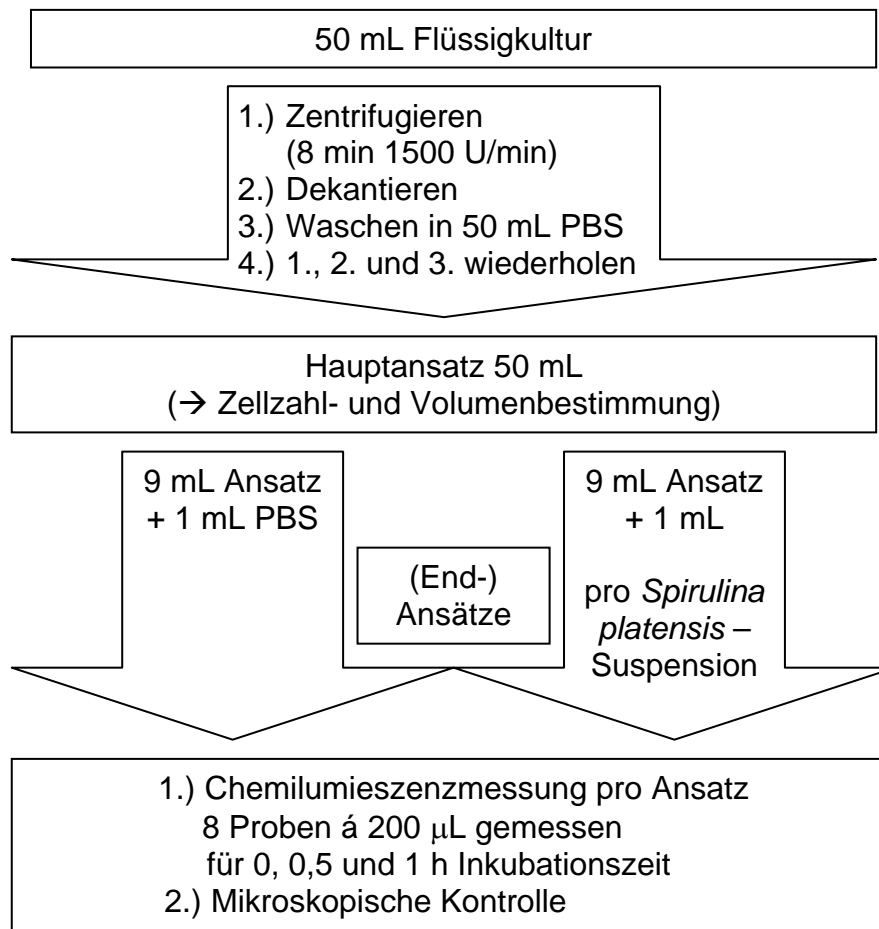


Abb. 6:

Versuchsablauf zur Messung der ROS-Bildung von Blastosporen

Es wurden Ansätze mit Blastosporen, Blastosporen + 0,01 mg/mL, + 0,1 mg/mL, + 1 mg/mL und + 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspensionen hergestellt. Die Messungen erfolgten sofort und nach Inkubationszeiten von einer halben und einer ganzen Stunde. Es wurden drei Experimente durchgeführt.

3.4.4 Messungen an Blastosporen (Vorkulturdauer 24 h)

Für die Chemilumineszenzmessungen an Blastosporen vom Stamm 3153A mit einer Vorkulturdauer von 24 Stunden wurden je 6 Proben pro Ansatz gemessen. Es wurden Ansätze mit Blastosporen, Blastosporen + 0,01 mg/mL, + 0,1 mg/mL, + 1 mg/mL und + 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspensionen hergestellt. Des Weiteren erfolgte die Herstellung eines Ansatzes mit äquivalenten Mengen an Vitamin C, wie sie die 10 mg/mL konzentrierte *Spirulina platensis*-Suspension nach Angaben des Herstellers enthält.

Die Messungen erfolgten sofort und nach Inkubationszeiten von einer halben und einer ganzen Stunde. Es wurden drei Experimente durchgeführt.

3.4.5 Messungen an Hyphen

Für die Chemilumineszenzmessungen an Hyphen vom Stamm 3153A (24 h Vorkulturdauer) und CA6 (11 und 24 h Vorkulturdauer) wurden je 10 Proben pro Ansatz gemessen (Tab. 2).

Tab. 2:

Die Versuche zur ROS-Bildung von Hyphen

Stamm	Vorkulturdauer 24 h	Vorkulturdauer 11 h
3153A	4	x
CA6	2	2

Das Vorgehen ist schematisch in Abb.7 zusammengefasst. Für die Ansätze wurden Zellen verwendet, die unterschiedlich lange hypheninduzierender Kulturbedingungen ausgesetzt waren.

Es wurden Ansätze mit Zellen und Zellen + 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension hergestellt. Vor der Chemilumineszenzmessungen der Hyphen wurden die Zellen aus den Ansätze, nachdem sie abzentrifugiert und in PBS gewaschen wurden, in ein Volumen von 10 mL PBS überführt (Abb. 7), um eine den Blastosporen-Versuchen vergleichbare Zellzahl zu erzielen.

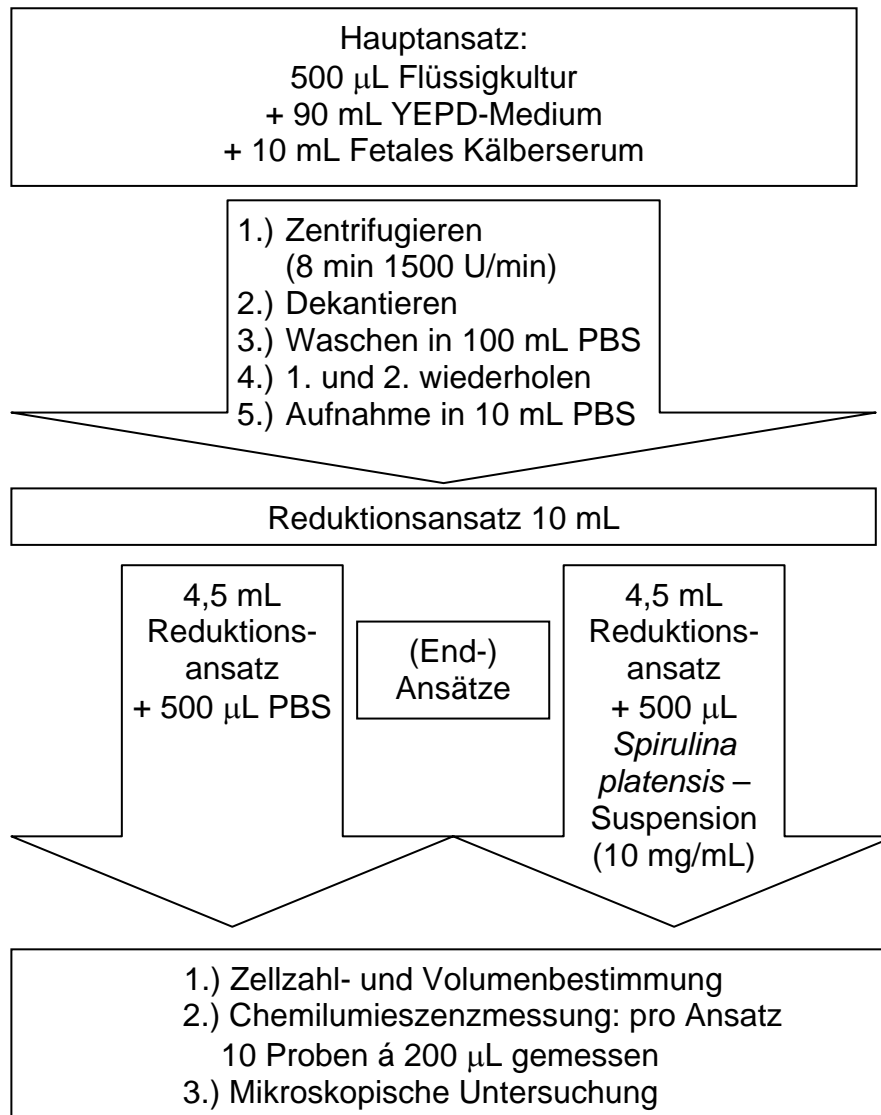


Abb.7:

Versuchsablauf zur Messung der ROS-Bildung von Hyphen

3.5 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programmpaket „SPSS 11.5 für Windows®“ (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Aus den Daten der Chemilumineszenzmessungen wurde pro gemessene Probe eines Ansatzes die Summe der cpm gebildet und der Mittelwert der Summen für einen Ansatz \pm Standardabweichung (SD) berechnet. Für den Vergleich dieser Mittelwerte der verschiedenen Ansätze wurde der Student-t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Für den Vergleich der Mittelwerte der Summen zwischen den Stämmen 3153A und CA6 wurde der Student-t-Test für unabhängige Stichproben gewählt.

In beiden Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ bei 2-seitiger Testung als statistisch signifikant festgelegt.

Der Trend in der Abnahme der cpm-Werte mit steigender *Spirulina*-Konzentration wurde für die Mittelwerte mit dem Trendtest nach von Neumann u. Mitarb. (Sachs, 1992, S. 481 - 482) und für die Einzelmessungen mit linearer Regression auf statistische Signifikanz geprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Messungen von Zellzahl und -volumen

Um Aussagen über Änderung der Zellzahl und des Zellvolumens in Abhängigkeit von der Zeit machen zu können, wurden Kulturen (vergleiche Kap. 3.3.) vom *Candida albicans*-Stamm 3153A über 24 Stunden beobachtet. In den so erhaltenen Wachstumskurven (Abb. 8) lassen sich die für *Candida albicans* bekannten Wachstumsphasen (Tab. 3) zuordnen.

Tab. 3:

Wachstumsphasen

Kulturdauer	Wachstumsphase
0 - 4 Stunden	„Lag“- Phase
4 - 10 Stunden	Phase exponentiellen Wachstums
10 - 21 Stunden	Phase der Dezeleration
21 - 24 Stunden	Stationäre Phase

Das Zellvolumen steigt über die erste Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase stark an und fällt in der zweiten Hälfte ebenso rapide wieder ab, um dann über den Rest der Kulturdauer nahezu konstant zu bleiben (Abb. 9).

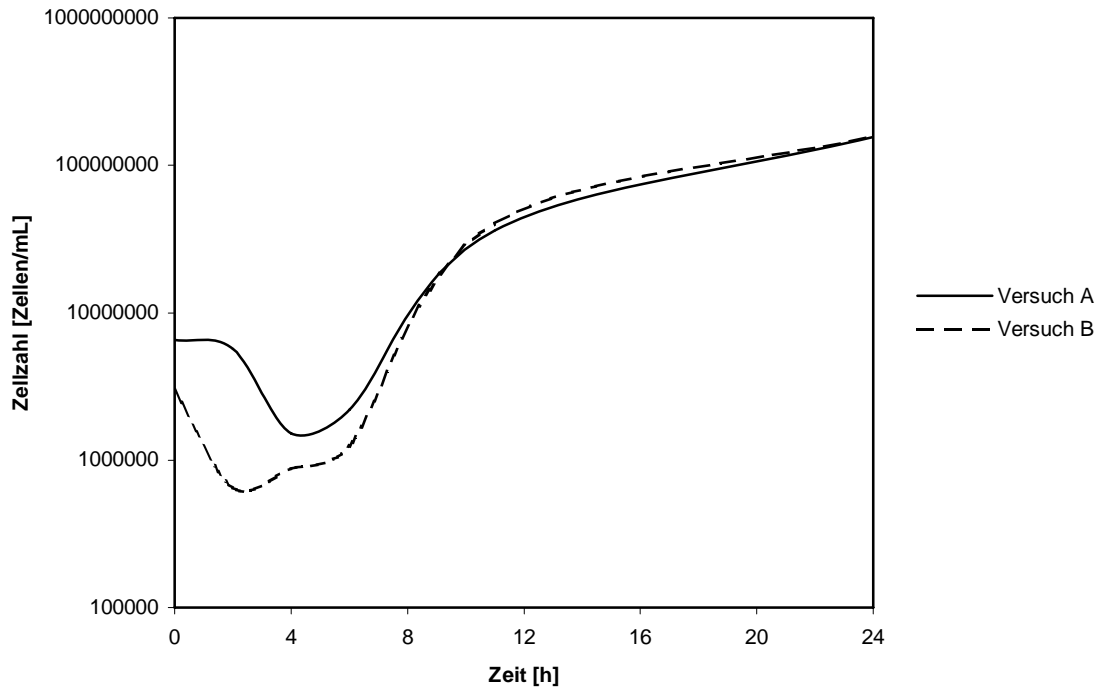


Abb. 8:

Bestimmung der Zellzahl über 24 h, Stamm 3153A

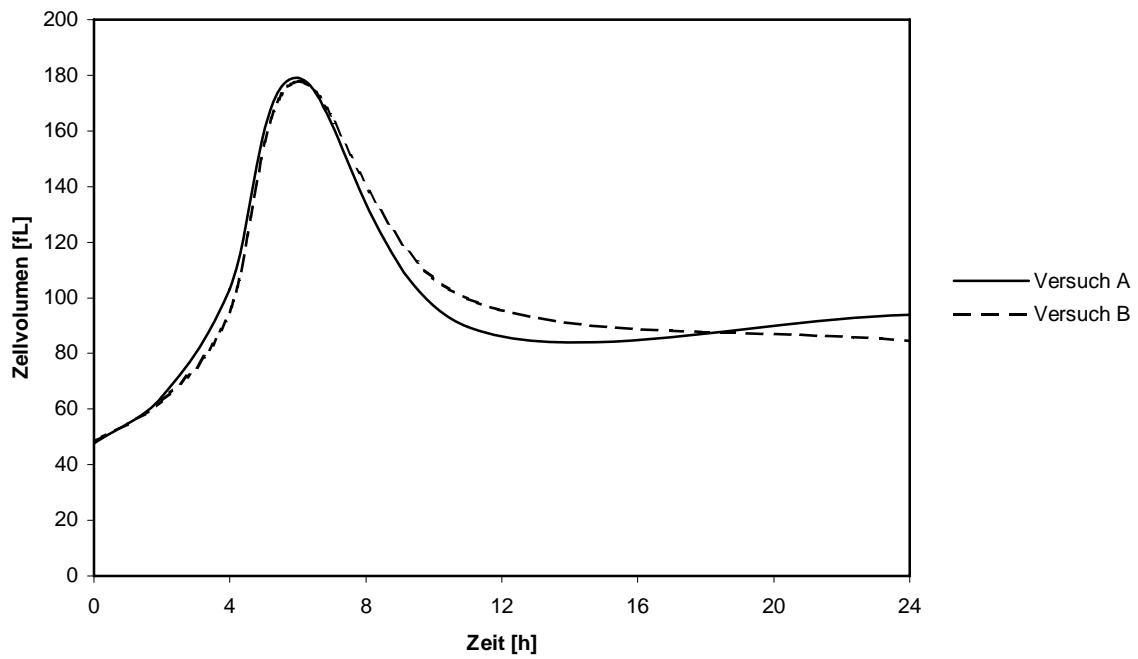


Abb. 9:

Bestimmung des Zellvolumens über 24 h, Stamm 3153A

4.2 Gleichzeitige Messung von Zellzahl und ROS

Im folgenden Versuch wurden über 24 Stunden gleichzeitig die Zellzahl und die ROS-Produktion für die *Candida albicans*-Stämme 3153A und CA6 untersucht (vergleiche Kap. 3.4.1). Für den Stamm 3153A ([Abb. 10](#), [Abb. 11](#)) ergab die kombinierte Messung von Zellzahl und ROS-Bildung, dass in den ersten 4 Stunden trotz der abnehmenden Zellzahl die ROS-Bildung stark ansteigt und nach ca. 6 Stunden ihr Maximum erreichte. Während sich ab diesem Zeitpunkt die Zellzahl bis zum Ende des Beobachtungszeitraums weiter stark erhöhte, änderte sich im Gegensatz dazu die Menge der gebildeten ROS kaum noch.

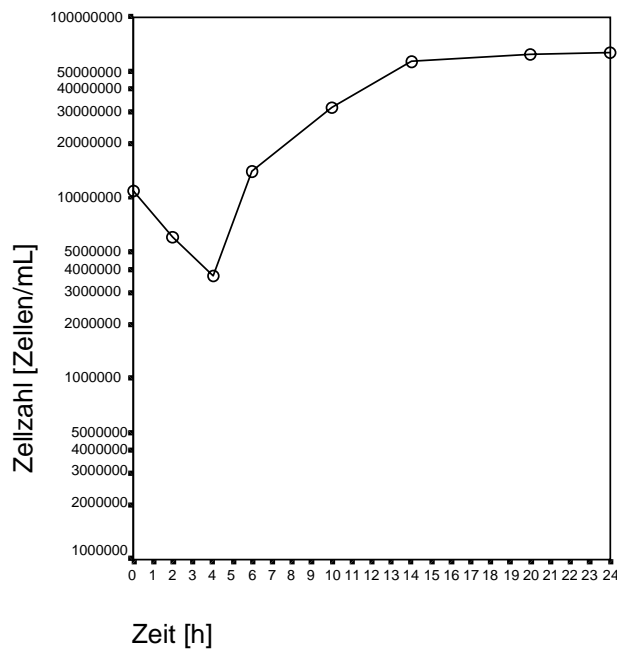


Abb.10:

Bestimmung der Zellzahl des Stammes 3153A über 24 Stunden

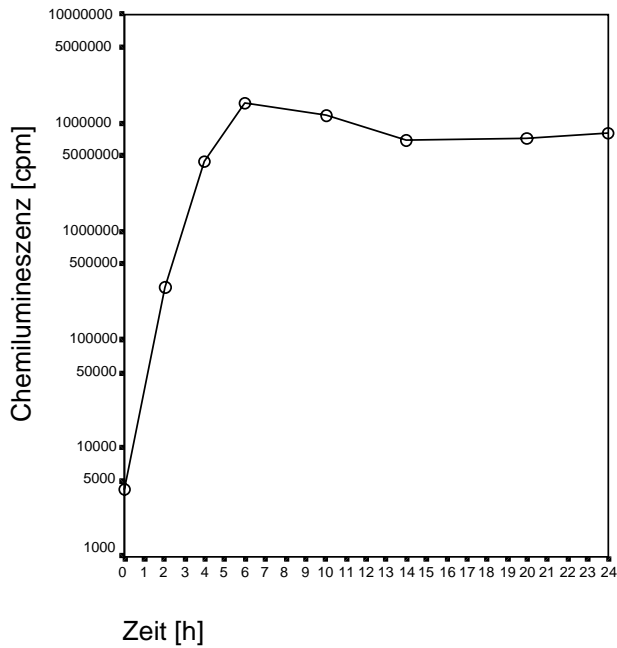


Abb. 11:

Messung der Chemilumineszenz [cpm] des Stammes 3153A über 24 h Stunden

Beim Stamm CA6 (Abb. 12, Abb. 13) war die Abnahme der Zellzahl geringer und von kürzerer Dauer. Auch hier wurde nach 6 Stunden fast das Maximum der ROS-Bildung beobachtet, wobei diese noch gering bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden weiter anstieg.

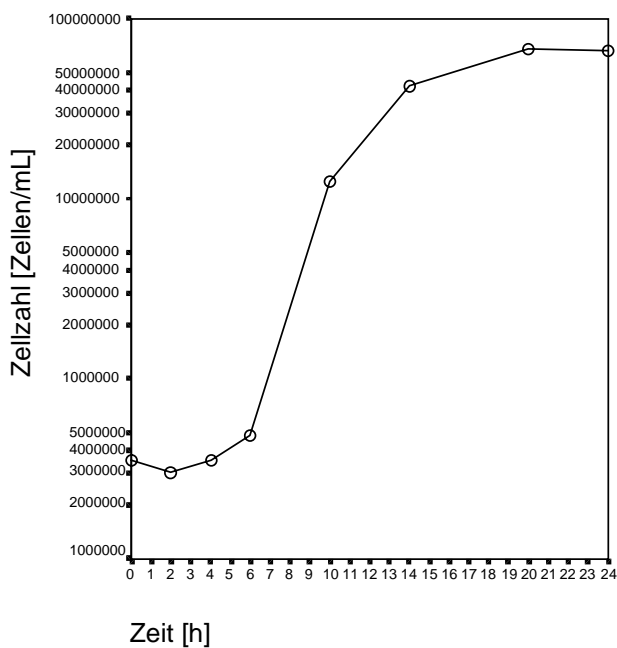


Abb. 12:

Bestimmung der Zellzahl des Stammes CA6 über 24 Stunden

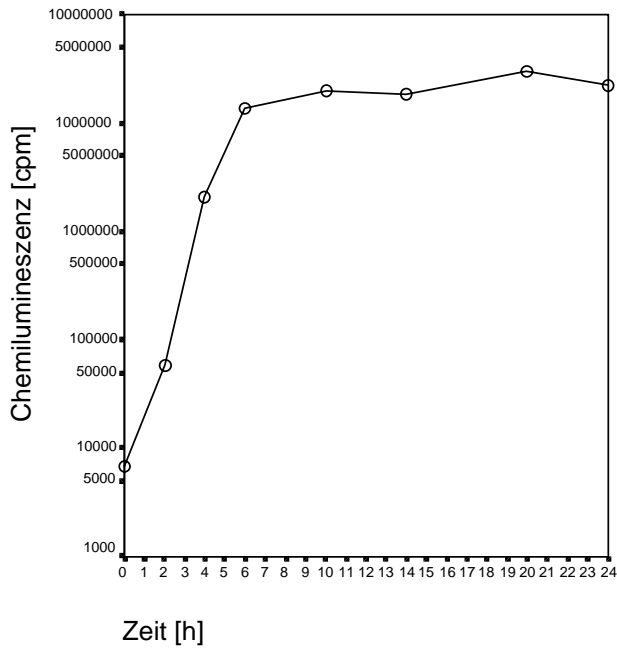


Abb. 13:

Messung der Chemilumineszenz [cpm] des Stammes CA6 über 24 Stunden

4.3 Messung der Chemilumineszenz an *Spirulina platensis*

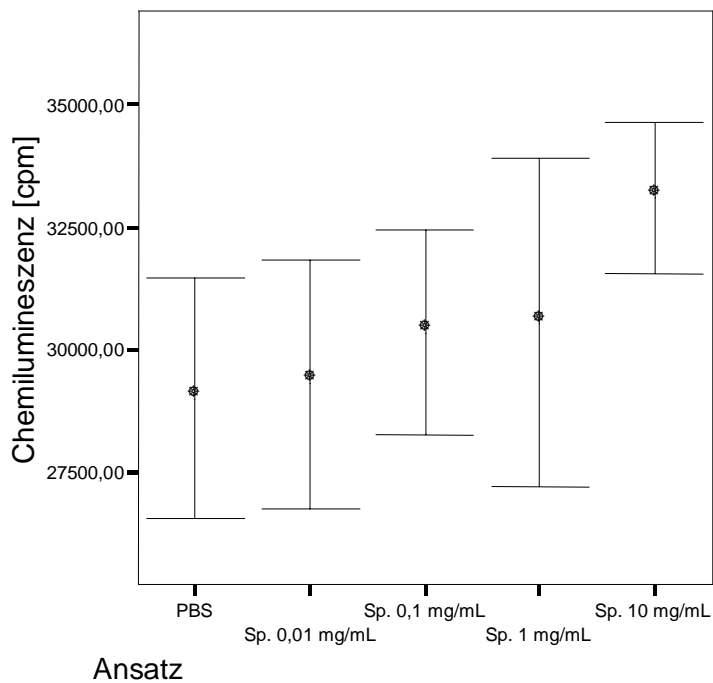


Abb.14:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] ± Standardabweichung,

Sp.: *Spirulina platensis* in PBS

Die Chemilumineszenz-Messung der *Spirulina platensis* -Suspensionen mit unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zum Lösungsmittel (PBS)-Leerwert (Abb. 14) ergab für die Suspensionen von *Spirulina platensis* gleiche oder geringfügig höhere Werte:

PBS: 29.300 ± 2.578 cpm;

0,01 mg/mL: 29.300 ± 2.529 cpm;

0,10 mg/mL: 30.350 ± 2.082 cpm;

1,00 mg/mL: 30.550 ± 3.359 cpm

10,00 mg/mL: 33.100 ± 1.537 cpm.

Nur für die 10 mg/mL - Suspension war die Differenz zum PBS-Leerwert statistisch signifikant ($p < 0,001$, 95 %-VB: 1.489 bis 6.110).

4.4 Der Einfluss von *Spirulina platensis*-Suspensionen auf die ROS-Bildung von Blastosporen (Vorkulturdauer 6 h) des Stammes 3153A

Es wurde der Einfluss von *Spirulina platensis*-Suspensionen mit den Konzentrationen 10 mg/mL, 1 mg/mL, 0,1mg/mL und 0,01 mg/mL auf die ROS-Bildung von Blastosporen des Stammes 3153A untersucht. Die Ansätze wurden nach Zugabe der Suspensionen ohne weitere Inkubationszeit (0 h) und mit Inkubationszeiten von 30 Minuten (0,5 h) und 1 Stunde (1 h) gemessen. Für die Versuche wurde die Zellzahl zwischen 10^6 – 10^7 Zellen/mL eingestellt.

Für die Ansätze ohne weitere Inkubation (Abb. 15, Tab. 4 und Tab. 5) war im Vergleich zum Blastosporen-Ansatz bei Zugabe einer 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspension eine Verminderung der ROS-Bildung von 94 % festzustellen, bei einer 1 mg/mL konzentrierten Suspension 78 %, bei einer 0,1 mg/ml konzentrierten Suspension 22 % und bei einer 0,01 mg/mL konzentrierten Suspension 34 %.

Im von-Neumann-Trendtest war die Abnahme der cpm-Mittelwerte mit steigender *Spirulina*-Konzentration (Tab.4) statistisch signifikant:

$D2/s2 = 0,759$, 1 % < p (2-seitig) < 5 %.

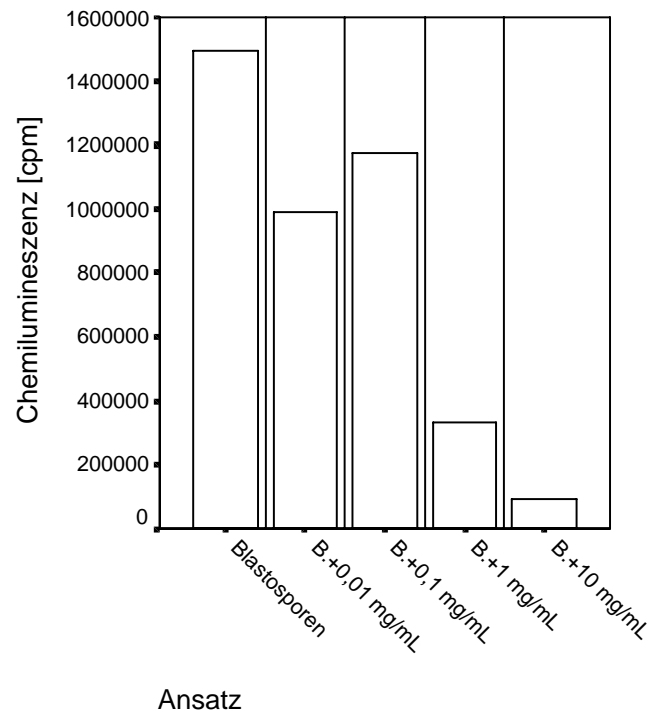


Abb. 15:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm], Inkubationszeit 0 h

Tab. 4:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Inkubationszeit 0 h

Ansatz	Chemilumineszenz [cpm]
Blastosporen	1.495.012 \pm 1.548.406
B. + 0,01 mg/mL	993.126 \pm 1.155.253
B. + 0,10 mg/mL	1.172.505 \pm 1.067.643
B. + 1,00 mg/mL	334.086 \pm 315.596
B. + 10,00 mg/mL	90.883 \pm 33.177

Tab. 5:

Prozentuale Veränderung der Chemilumineszenz [cpm], Inkubationszeit 0 h

Ansatz	Blastosporen	B. + 0,01 mg/mL	B. + 0,1 mg/mL	B. + 1 mg/mL	B. + 10 mg/mL
Blastosporen	0 %	x	x	x	x
B. + 0,01 mg/mL	-34 %	0 %	x	x	x
B. + 0,10 mg/mL	-22 %	+18 %	0 %	x	x
B. + 1,00 mg/mL	-78 %	-66 %	-72 %	0 %	x
B. + 10,00 mg/mL	-94 %	-91 %	-92 %	-73 %	0 %

Für die Ansätze mit dreißigminütiger Inkubation (Abb. 16, Tab. 6 und Tab. 7) war im Vergleich zum Blastosporen-Ansatz bei Zugabe einer 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspension eine Verminderung der ROS-Bildung von 88 % festzustellen, bei einer 1 mg/mL konzentrierten Suspension 69 %, bei einer 0,1 mg/mL konzentrierten Suspension 13 % und bei einer 0,01 mg/mL konzentrierten Suspension 25 %. Im von-Neumann-Trendtest war die Abnahme der cpm-Mittelwerte mit steigender *Spirulina*-Konzentration (Tab.6) statistisch signifikant:

$D2/s2 = 0,745$, $1 \% < p$ (2-seitig) $< 5 \%$.

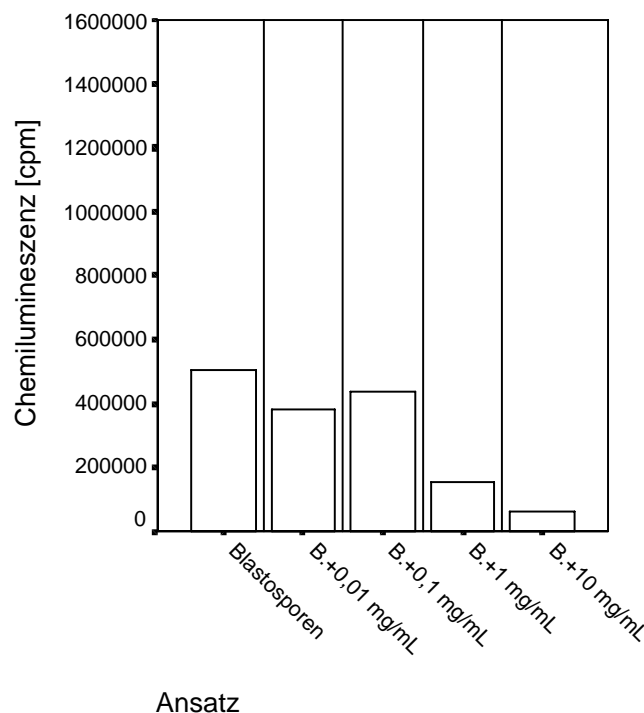


Abb. 16:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm], Inkubationszeit 0,5 h

Tab. 6:Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Inkubationszeit 0,5 h

Ansatz	Chemilumineszenz [cpm]
Blastosporen	502.837 \pm 667.440
B. + 0,01 mg/mL	378.945 \pm 467.590
B. + 0,10 mg/mL	437.591 \pm 511.486
B. + 1,00 mg/mL	154.134 \pm 157.232
B. + 10,00 mg/mL	60.031 \pm 8.797

Tab. 7:

Prozentuale Veränderung der Chemilumineszenz [cpm], Inkubationszeit 0,5 h

Ansatz	Blastosporen	B. + 0,01 mg/mL	B. + 0,1 mg/mL	B. + 1 mg/mL	B. + 10 mg/mL
Blastosporen	0 %	x	x	x	x
B. + 0,01 mg/mL	-25 %	0 %	x	x	x
B. + 0,10 mg/mL	-13 %	+15 %	0 %	x	x
B. + 1,00 mg/mL	-69 %	-59 %	-65 %	0 %	x
B. + 10,00 mg/mL	-88 %	-84 %	-86 %	-61 %	0 %

Für die Ansätze mit 1-stündiger Inkubation (Abb. 17, Tab. 8 und Tab. 9) war im Vergleich zum Blastosporen-Ansatz bei Zugabe einer 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspension eine Verminderung der ROS-Bildung von 88 % festzustellen, bei einer 1 mg/mL konzentrierten Suspension 69 %, bei einer 0,1 mg/ml konzentrierten Suspension 7 % und bei einer 0,01 mg/mL konzentrierten Suspension 24 %.

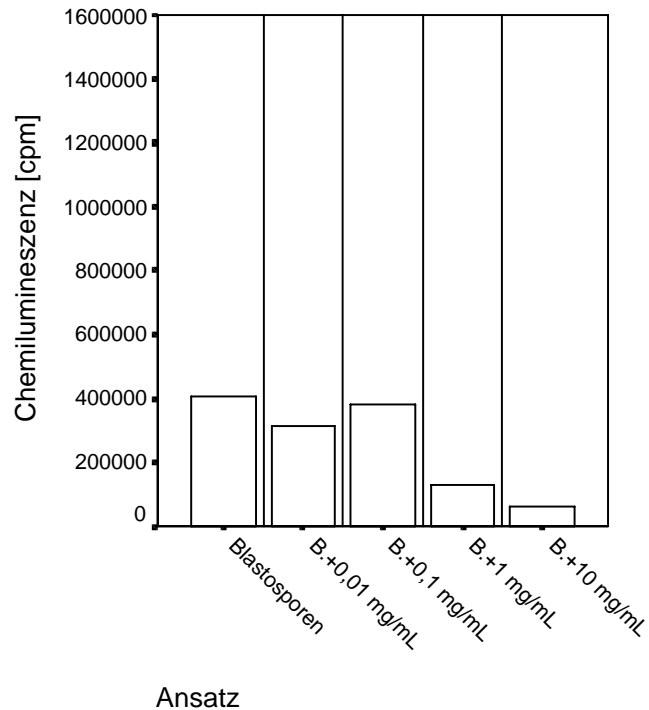


Abb.17: Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm], Inkubationszeit 1 h

Tab. 8:

Mittelwert Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Inkubationszeit 1 h

Ansatz	Chemilumineszenz [cpm]
Blastosporen	407.162 \pm 454.802
B. + 0,01 mg/mL	311.312 \pm 436.316
B. + 0,10 mg/mL	378.783 \pm 408.963
B. + 1,00 mg/mL	127.305 \pm 122.256
B. + 10,00 mg/mL	59.476 \pm 9.524

Tab. 9:

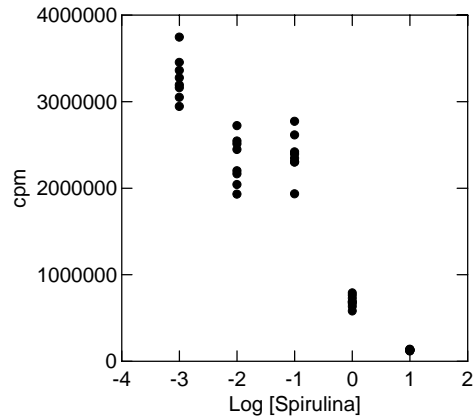
Prozentuale Veränderung der Chemilumineszenz [cpm], Inkubationszeit 1 h

Ansatz	Blastosporen	B. + 0,01 mg/mL	B. + 0,1 mg/mL	B. + 1 mg/mL	B. + 10 mg/mL
Blastosporen	0 %	x	x	x	x
B. + 0,01 mg/mL	-24 %	0 %	x	x	x
B. + 0,10 mg/mL	-7 %	+22 %	0 %	x	x
B. + 1,00 mg/mL	-69 %	-59 %	-66 %	0 %	x
B. + 10,00 mg/mL	-85 %	-81 %	-84 %	-53 %	0 %

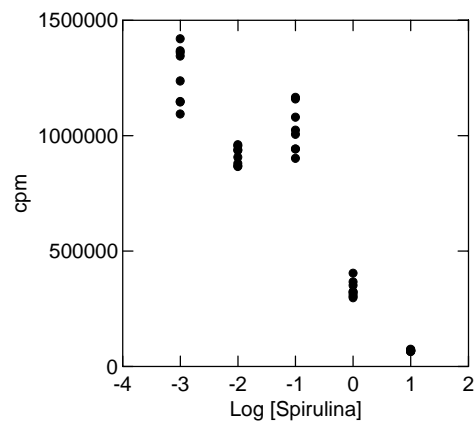
Im von-Neumann-Trendtest war die Abnahme der cpm-Mittelwerte mit steigender *Spirulina*-Konzentration (Tab.8) bei 2-seitiger Testung statistisch eben nicht mehr signifikant: $D^2/s^2 = 0,848$ (p (2-seitig) $< 5\%$ gilt für $D^2/s^2 < 0,820$).

Bei Anwendung des Student-t-Tests auf die Mittelwerte konnte die Gültigkeit der Ergebnisse über die gemessene Stichprobe hinaus nur für die Differenz der Mittelwerte zwischen den Ansätzen mit Blastosporen und Blastosporen + 10 mg/mL *Spirulina platensis*-Suspension bei einstündiger Inkubationszeit nachgewiesen werden ($p < 0,05$, 95 %-VB: 8.323 bis 183.376). Der Vergleich der Ansätze mit *Spirulina platensis* Zugabe untereinander erreichte zu keiner der Inkubationszeiten das vorgegebene Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

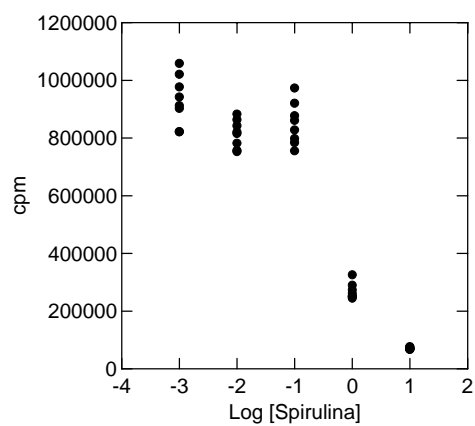
Werden jedoch die jeweils 8 Messungen eines Versuches gegen den Logarithmus der *Spirulina*-Konzentration aufgetragen – mit der Angabe des Nullwertes (keine Zugabe von *Spirulina*) als -3 – dann wird die Dosisabhängigkeit in allen 3 Reihen noch deutlicher (Abb. 18 a-c). Die lineare Regression ist statistisch hoch signifikant: Die Korrelationskoeffizienten r sind 0,9480; 0,9276 und 0,9107 für 0, 30 und 60 Minuten Inkubation. Die Varianzanalyse der drei Regressionen ergibt dabei eine F-Ratio von 337,0; 234,4 und 184,7. Die Signifikanz ist in allen drei Fällen $p < 10^{-6}$. Wie schon bei den Mittelwerten gezeigt wurde, ist eine Zeitabhängigkeit der ROS-Hemmung nicht erkennbar: Schon ohne Inkubation ist sie mit der höchsten *Spirulina*-Konzentration nahezu vollständig (96,1; 94,9 und 94,2 % für 0 h, 0,5 h und 1 h Inkubation).



(a)



(b)



(c)

Abb. 18 a-c:

Die Konzentrations-Abhängigkeit der ROS-Hemmung von *Candida albicans* 3153A durch *Spirulina platensis*-Biomasse. Y-Achse: Chemilumineszenz [cpm]; X-Achse: Logarithmus der Konzentration in der *Spirulina*-Suspension. Inkubationszeiten nach Zugabe von *Spirulina*: 0 h (a), 0,5 h (b) und 1 h (c).

4.5 Der Einfluss der Inkubationszeit auf die ROS-Bildung von Blastosporen des Stammes 3153A

Es wurde die Fragestellung untersucht, ob über die Inkubationszeit der zu messenden Ansätze eine Veränderung der mit lucigeninverstärkter Chemilumineszenz messbaren ROS-Bildung bzw. der resultierenden cpm (Abb. 19, Tab. 11) stattfindet.

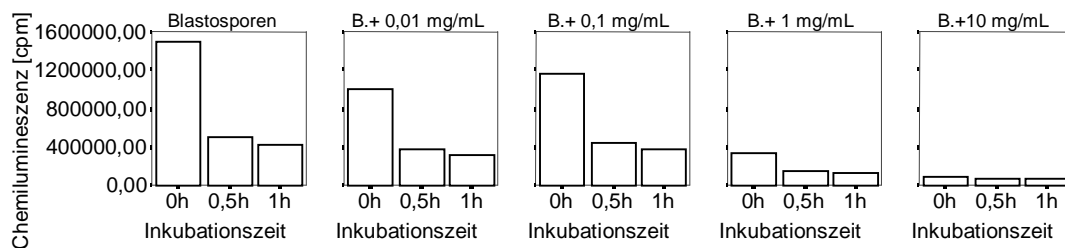


Abb. 19:

Mittelwert der Chemilumineszenz [cpm] getrennt dargestellt nach Ansätzen und Inkubationszeiten

Der Mittelwert der cpm der Ansätze ohne *Spirulina platensis* Zugabe und ohne Inkubationszeit (0 h) war 3-mal höher als zur Inkubationszeit 0,5 h und zur Inkubationszeit 1 h 3,7-mal höher.

In den Ansätzen mit 0,01 mg/mL ohne Inkubationszeit (0 h) war der Mittelwert der cpm 2,6-mal höher als zur Inkubationszeit 0,5 h und zur Inkubationszeit 1 h 3,2-mal höher.

In den Ansätzen mit 0,1 mg/mL ohne Inkubationszeit (0 h) lag der Mittelwert der cpm 2,7-mal höher als zur Inkubationszeit 0,5 h und zur Inkubationszeit 1 h 3,1-mal höher.

In den Ansätzen mit 1 mg/mL ohne Inkubationszeit (0 h) erreichte der Mittelwert der cpm das 2,2-Fache im Vergleich zur Inkubationszeit 0,5 h und zur Inkubationszeit 1 h das 2,6-fache.

In den Ansätzen mit 10 mg/mL ohne Inkubationszeit (0 h) war der Mittelwert der cpm 1,5-mal höher als zur Inkubationszeit 0,5 h und zur Inkubationszeit 1 h 1,5-mal höher.

In allen Ansätzen war der Mittelwert der cpm zur Inkubationszeit 0,5 h 1-1,2-mal höher als zur Inkubationszeit 1 h.

Tab. 11:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD

Inkubationszeit	Blastosporen	B. + 0,01 mg/mL	B. + 0,1 mg/mL	B. + 1 mg/mL	B. + 10 mg/mL
0 h	1.495.012 \pm 1.548.406	993.126 \pm 1.155.253	1.172.505 \pm 1.067.643	334.086 \pm 315.596	90.883 \pm 33.177
0,5 h	502.837 \pm 667.440	378.945 \pm 467.590	437.591 \pm 511.486	154.134 \pm 157.232	60.031 \pm 8.797
1 h	407.162 \pm 454.802	311.312 \pm 436.316	378.783 \pm 408.963	127.305 \pm 122.256	59.476 \pm 9.524

Für die einzelnen Ansätze mit Blastosporen, B. + 0,01 mg/mL, B. + 0,1 mg/mL, B. + 1 mg/mL und B. + 10 mg/mL ergab sich für die Differenzen der Mittelwerte der cpm zwischen den Inkubationszeiten 0 h und 0,5 h keine Signifikanz ($p < 0,05$), ebenso wenig bei 0 h und 1 h und bei 0,5 h und 1 h.

4.6 Vergleichende Untersuchungen von Blastosporen (Vorkulturdauer 24 h) des Stammes 3153A nach Behandlung mit *Spirulina platensis*- Suspension und Vitamin C- Lösung

Für diese Versuche wurden 24 h alte Vorkulturen verwendet, die Zellzahl auf 10^8 Zellen/mL eingestellt. Nach Zugabe der *Spirulina platensis*-Suspensionen und einer dem Vitamin C-Anteil der 10 mg/mL Suspension äquivalenten - Vitamin C-Lösung, fand sofort die Messung statt.

Für die Ansätze mit *Spirulina platensis* (Abb. 20, Tab. 12 und Tab. 13) war im Vergleich zum Blastosporen-Ansatz bei Zugabe einer 10 mg/mL konzentrierten Suspension eine Verminderung der ROS-Bildung um 94 % festzustellen, bei einer 1 mg/mL konzentrierten Suspension um 57 %. Im Gegensatz dazu kam es bei einer 0,1 mg/ml konzentrierten Suspension zu einer Zunahme der ROS-Bildung um 35 % und bei einer 0,01 mg/mL konzentrierten Suspension zu einer Zunahme um 32 %. Die Zugabe einer Vitamin C-Lösung - zur 10 mg/mL *Spirulina platensis*-Suspension äquivalente Konzentration an Vitamin C - führte zu einer Verminderung der Chemilumineszenz um 70 %.

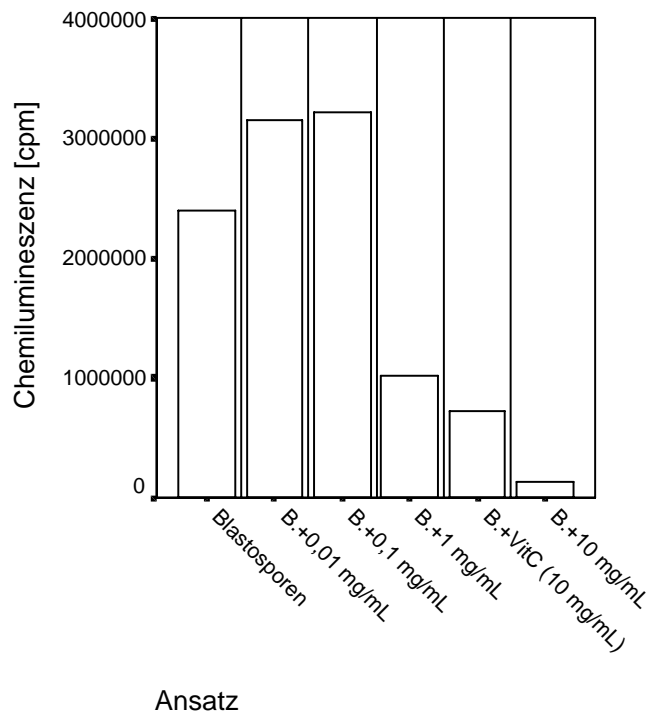


Abb. 20:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm]

Tab. 12:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, 24 h Vorkultur der Blastosporen

Ansatz	Chemilumineszenz [cpm]
Blastosporen	2.388.985 \pm 2.198.779
B. + 0,01 mg/mL	3.143.061 \pm 2.837.281
B. + 0,1 mg/mL	3.215.258 \pm 3.474.162
B. + 1 mg/mL	1.017.600 \pm 1.258.397
B. + VitC (10 mg/mL)	717.583 \pm 700.910
B. + 10 mg/mL	136.811 \pm 82.657

Tab. 13:

Prozentuale Veränderung Chemilumineszenz [cpm], 24 h Vorkultur der Blastosporen

Ansatz	Blastosporen	B. + 0,01 mg/mL	B. + 0,1 mg/mL	B. + 1 mg/mL	B. + VitC (10 mg/mL)	B. + 10 mg/mL
Blastosporen	0 %	X	x	x	x	x
B. + 0,01 mg/mL	+32 %	0 %	x	x	x	x
B. + 0,10 mg/mL	+35 %	+2 %	0 %	x	x	x
B. + 1,00 mg/mL	-57 %	-68 %	-68 %	0 %	x	x
B. + VitC (10 mg/mL)	-70 %	-77 %	-78 %	-29 %	0 %	x
B. + 10,00 mg/mL	-94 %	-96 %	-96 %	-87 %	-81 %	0 %

Keiner der Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen war signifikant ($p > 0,05$).

4.6 ROS-Bildung der Stämme 3153A und CA6 unter hypheninduzierenden Kulturbedingungen und deren Beeinflussung durch eine Suspension von *Spirulina platensis*

4.7.1 Stamm 3153A (Vorkulturdauer 24 h)

Die mikroskopischen Untersuchungen zum Grad der Hyphenbildung unter hypheninduzierenden Bedingungen ergaben für die Zellen ohne Inkubation (0 h) keine Hyphenbildung (Blastosporen-Phase), nach 30-minütiger Inkubation (0,5 h) ca. 80 % Hyphenbildung (Phase der Hyphen-Entwicklung) und nach einstündiger Inkubation (1 h) 100 % Hyphenbildung (Hyphen-Phase).

Die gemessenen Zellzahlen in Zellen/mL verhielten sich über die Inkubationszeit wie folgt: Blastosporen-Phase > Phase der Hyphen-Entwicklung > Hyphen-Phase.

Zwischen den Ansätzen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe bestand diesbezüglich kein Unterschied. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen der Inkubationszeit waren signifikant ($p < 0,05$).

Das ebenfalls bestimmte Zellvolumen in fL (Abb. 4) verhielt sich über die Inkubationszeit umgekehrt zur Zellzahl: Blastosporen-Phase < Phase der Hyphen-Entwicklung < Hyphen-Phase. Zwischen den Ansätzen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe bestand auch hier kein Unterschied. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen der Inkubationszeit waren signifikant ($p < 0,05$).

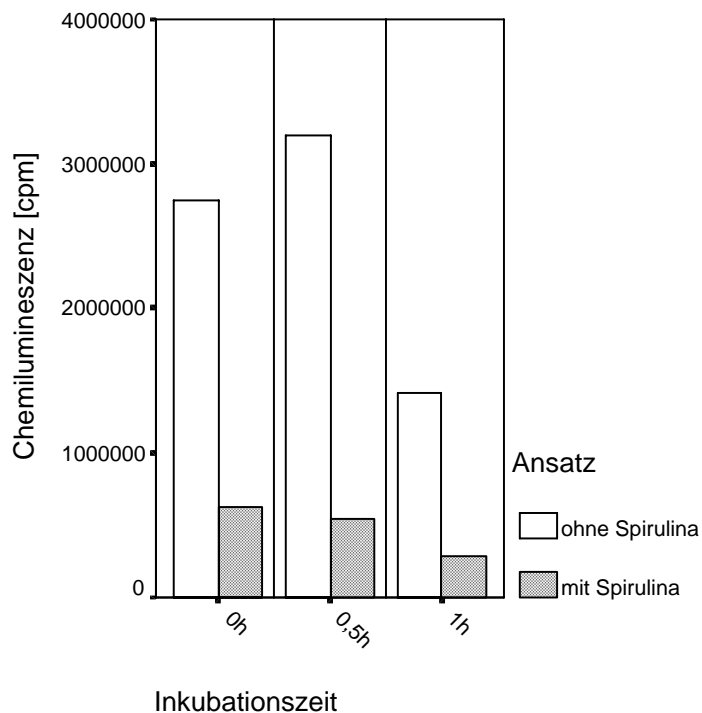


Abb. 21:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] des Stammes 3153A (Vorkulturdauer 24 h) unmittelbar nach Inkubation unter hypheninduzierenden Bedingungen (FKS).

0 h: Blastosporen-Phase, 0,5 h: Phase der Hyphen-Entwicklung, 1 h: Hyphen-Phase

Die Chemilumineszenz-Messung in der Blastosporen-Phase (Abb. 21, Tab.14) ergab, dass die Anzahl der gemessenen cpm im Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension gegenüber dem Ansatz ohne um 77 (71 - 79) % vermindert (Tab. 14) war.

Tab. 14:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] ± SD, Blastosporen-Phase

Ansatz	Blastosporen-Phase
ohne <i>Spirulina platensis</i>	2.750.182 ± 1.631.765
mit <i>Spirulina platensis</i>	626.010 ± 324.716

In der Phase der Hyphen-Entwicklung war zwischen dem Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension und ohne Zugabe die ROS-Bildung um 83 (77 - 86) % vermindert (Abb.21, Tab. 15). Ohne Zugabe von *Spirulina*

war die ROS-Bildung in der Phase der Hyphen-Entwicklung gegenüber der Blastosporen-Phase erhöht.

Tab. 15:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Phase der Hyphen-Entwicklung

Ansatz	Phase der Hyphen-Entwicklung
ohne <i>Spirulina platensis</i>	3.194.722 \pm 1.909.147
mit <i>Spirulina platensis</i>	539.565 \pm 213.789

In der Hyphen-Phase war im Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension die aus der Chemilumineszenz resultierenden cpm gegenüber dem Ansatz ohne Zugabe um 80 (74 - 83) % vermindert (Tab. 16). In dieser Phase war die ROS-Bildung im Vergleich zur Phase der Hyphen-Entwicklung erniedrigt.

Tab. 16:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Hyphen-Phase

Ansatz	Hyphen-Phase
ohne <i>Spirulina platensis</i>	1.418.377 \pm 441.235
mit <i>Spirulina platensis</i>	287.145 \pm 55.714

Signifikante Unterschiede für die Mittelwert-Differenzen der Ansätze mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe fanden sich für die Blastosporen- ($p < 0,05$, 95 %-VB: 43.617 bis 4.204.727) und Hyphen-Phase ($p < 0,05$, 95 %-VB: 495.758 bis 1.766.706). Die Ergebnisse der Hyphen-Entwicklungs-Phase verfehlten das Signifikanzniveau knapp ($p = 0,052$, 95 %-VB: -51.151 bis 5.361.466).

4.7.2 Stamm CA6

4.7.2.1 Vorkulturdauer 11 h

Die mikroskopische Untersuchung zum Grad der Hyphenbildung ergab, dass es ohne Inkubation (0 h) nicht zur Hyphenbildung kam (Blastosporen-Phase). Nach 30-minütiger Inkubation (0,5 h) hatten sich zu ca. 80 % Hyphen gebildet (Phase der

Hyphen-Entwicklung) und nach einstündiger Inkubation (1 h) hatten sich 100 % Hyphen gebildet (Hyphen-Phase).

Die gemessenen Zellzahlen in Zellen/mL verhielten sich über die Inkubationszeit wie folgt: Blastosporen-Phase > Phase der Hyphen-Entwicklung > Hyphen-Phase. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen waren diesbezüglich für die Ansätze der Blastosporen-Phase und Hyphen-Entwicklungs-Phase signifikant ($p < 0,05$). Zwischen den Ansätzen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe bestand kein Unterschied.

Das ebenfalls bestimmte Zellvolumen in fL verhielten sich über die Inkubationszeit umgekehrt zur Zellzahl: Blastosporen-Phase < Phase der Hyphen-Entwicklung < Hyphen-Phase. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen waren für die Ansätze der Blastosporen-Phase und Hyphen-Entwicklungs-Phase ohne *Spirulina platensis* Zugabe signifikant ($p < 0,05$). Zwischen den Ansätzen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe bestand in der Phase der Hyphen-Entwicklung ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

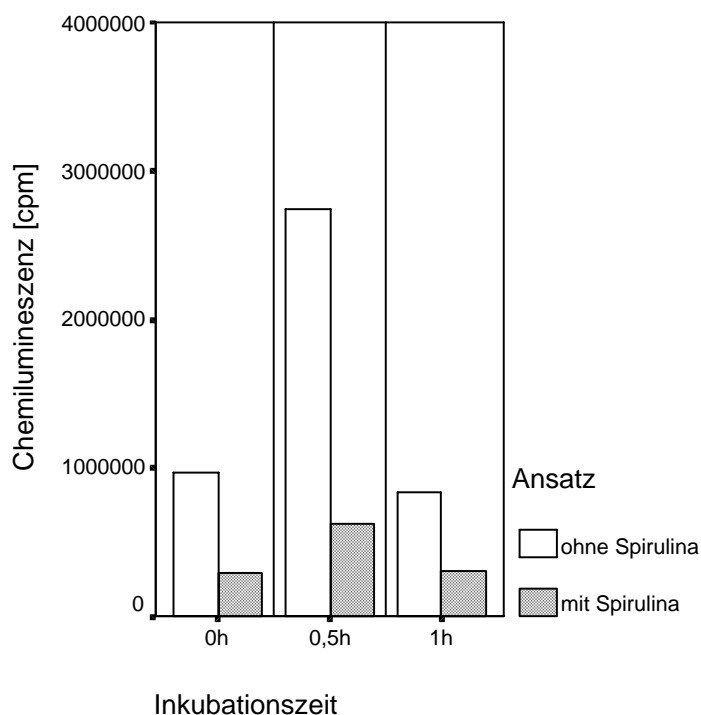


Abb. 22:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] des Stammes CA6 (Vorkulturdauer 11 h) unmittelbar nach Inkubation unter hypheninduzierenden Bedingungen (FKS).

0 h: Blastosporen-Phase; 0,5 h: Phase der Hyphen-Entwicklung; 1 h: Hyphen-Phase.

Die Chemilumineszenzmessung (Abb. 22, Tab.17) in der Blastosporen-Phase ergab, dass die Anzahl der gemessenen cpm im Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension gegenüber dem Ansatz ohne um 70 % vermindert war.

Tab. 17:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Blastosporen-Phase

Ansatz	Blastosporen-Phase
ohne <i>Spirulina platensis</i>	960.765 \pm 360.645
mit <i>Spirulina platensis</i>	291.120 \pm 91.301

In der Phase der Hyphen-Entwicklung war zwischen dem Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension und ohne Zugabe die ROS-Bildung um 77 % vermindert (Abb. 22, Tab. 18). In dieser Phase war die ROS-Bildung gegenüber der Blastosporen-Phase erhöht.

Tab. 18:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Phase der Hyphen-Entwicklung

Ansatz	Phase der Hyphen-Entwicklung
ohne <i>Spirulina platensis</i>	2.742.675 \pm 50.635
mit <i>Spirulina platensis</i>	622.095 \pm 231.414

In der Hyphen-Phase waren im Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension die Höhe der Chemilumineszenz gemessen in cpm gegenüber dem Ansatz ohne Zugabe um 64 % vermindert (Abb. 21, Tab. 19). Im Vergleich zur Phase der Hyphen-Entwicklung war die ROS-Bildung erniedrigt.

Tab. 19:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Hyphen-Phase

Ansatz	Hyphen-Phase
ohne <i>Spirulina platensis</i>	834.000 \pm 25.498
mit <i>Spirulina platensis</i>	299.475 \pm 78.213

Die Unterschiede der Mittelwerte der cpm zwischen den Ansätzen mit und ohne Zugabe einer 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspension waren in der Hyphen-Phase signifikant ($p < 0,05$, 95 %-VB: 60.901 bis 1.008.148). Die Mittelwert-Differenz zwischen den Ansätzen ohne *Spirulina platensis* in der Hyphen-Entwicklungs- und Hyphen-Phase erreichten das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (95 %-VB: 1.682.822 bis 2.134.527).

4.7.2.2 Vorkulturdauer 24 h

Die mikroskopischen Untersuchungen zum Grad der Hyphenbildung ergaben, dass es ohne Inkubation (0 h) nicht zur Hyphenbildung kam (Blastosporen-Phase), nach 30-minütiger Inkubation (0,5 h) hatten sich zu ca. 50 % Hyphen gebildet (Phase der Hyphen-Entwicklung) und nach einstündiger Inkubation (1 h) hatten sich ca. 90 % Hyphen gebildet (Hyphen-Phase).

Die gemessenen Zellzahlen in Zellen/mL verhielten sich über die Inkubationszeit wie folgt: Blastosporen-Phase > Phase der Hyphen-Entwicklung > Hyphen-Phase.

Zwischen den Ansätzen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe bestand diesbezüglich kein Unterschied. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen der Inkubationszeit waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Das ebenfalls bestimmte Zellvolumen in fL verhielten sich über die Inkubationszeit umgekehrt zur Zellzahl: Blastosporen-Phase < Phase der Hyphen-Entwicklung < Hyphen-Phase. Zwischen den Ansätzen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe bestand auch hier kein Unterschied. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen der Inkubationszeit waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Chemilumineszenzmessung (Abb. 23, Tab. 20) in der Blastosporen-Phase ergab, dass die Anzahl der gemessenen cpm im Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension gegenüber dem Ansatz ohne um 82 % vermindert war.

In der Phase der Hyphen-Entwicklung war die ROS-Bildung zwischen dem Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension und ohne Zugabe um 81 % vermindert (Abb. 23, Tab. 21). Die ROS-Bildung war in dieser Phase gegenüber der Blastosporen-Phase erniedrigt.

In der Hyphen-Phase waren im Ansatz mit Zugabe von 10 mg/mL konzentrierter *Spirulina platensis*-Suspension die aus der Chemilumineszenz resultierenden cpm gegenüber dem Ansatz ohne Zugabe um 75 % vermindert (Abb. 23, Tab. 22). Dazu war die ROS-Bildung im Vergleich zur Phase der Hyphen-Entwicklung erniedrigt.

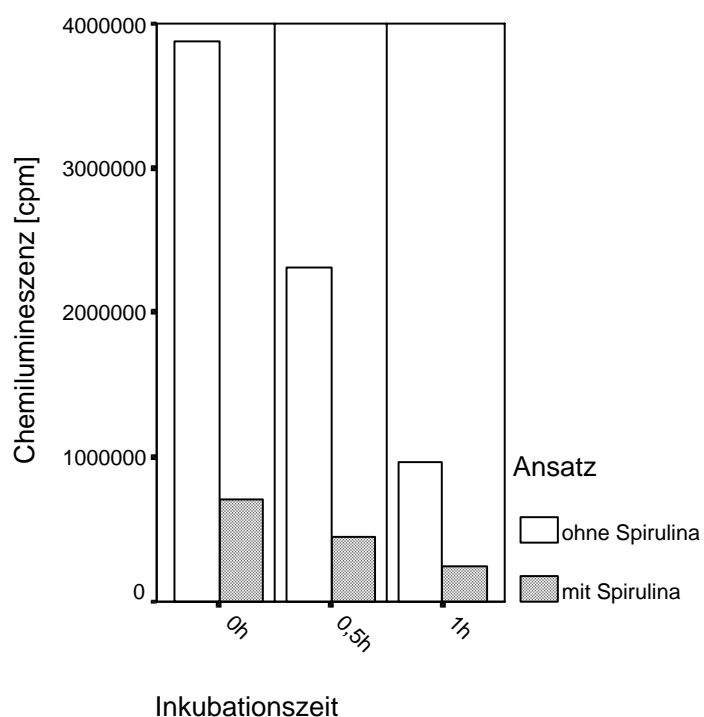


Abb. 23:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] des Stammes CA6 (Vorkulturdauer 24 h). unmittelbar nach Inkubation unter hypheninduzierenden Bedingungen (FKS).
0 h: Blastosporen-Phase; 0,5 h: Phase der Hyphen-Entwicklung; 1 h: Hyphen-Phase.

Tab. 20:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Blastosporen-Phase

Ansatz	Blastosporen-Phase
ohne <i>Spirulina platensis</i>	3.879.780 \pm 782.936
mit <i>Spirulina platensis</i>	706.230 \pm 211.750

Tab. 21:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Phase der Hyphen-Entwicklung

Ansatz	Phase der Hyphen-Entwicklung
ohne <i>Spirulina platensis</i>	2.313.900 \pm 373.267
mit <i>Spirulina platensis</i>	444.150 \pm 20.237

Tab. 22:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] \pm SD, Hyphen-Phase

Ansatz	Hyphen-Phase
ohne <i>Spirulina platensis</i>	968.460 \pm 149.934
mit <i>Spirulina platensis</i>	244.110 \pm 51.293

Die Unterschiede der Mittelwerte der cpm zwischen den Ansätzen mit und ohne Zugabe einer 10 mg/mL konzentrierten *Spirulina platensis*-Suspension waren zu keinem Messzeitpunkt signifikant ($p > 0,05$). Des Weiteren wurde in den Gruppen mit und ohne *Spirulina platensis* Zugabe zwischen den einzelnen Phasen das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreicht.

4.7.2.3 Vergleich zwischen 11- und 24 h Vorkulturdauer

Vom Stamm CA6 wurden Zellen mit 11 und 24 Stunden Vorkulturdauer auf ihre Unterschiede hinsichtlich morphologischer Veränderungen und ROS-Bildung unter hypheninduzierenden Bedingungen untersucht. Bei den Untersuchungen war die Zellzahl mit 10^7 Zellen/mL für beide Stämme gleich. Ohne Inkubation war sowohl für die 11-Stunden- als auch für die 24-Stunden-Zellen keine Hyphenbildung zu beobachten. Nach halbstündiger Inkubation hatten sich - gegenüber ca. 50 % bei den 24-Stunden-Zellen - die 11-Stunden-Zellen bereits zu ca. 80 % zu Hyphen entwickelt. Nach einstündiger Inkubation waren es für die 11-Stunden-Zellen 100 % und für die 24-Stunden-Zellen 90 % Hyphen. Der Vergleich der Ergebnisse der Chemilumineszenzmessung bezüglich der ROS-Bildung ([Abb. 24](#)) ergab für die Ansätze ohne *Spirulina platensis* Zugabe in der Blastosporen-Phase für die 24-Stunden-Zellen deutlich höhere Werte als für die 11-Stunden-Zellen. In der Phase der Hyphen-Entwicklung war das Verhältnis umgekehrt und in der Hyphen-Phase zeigten die 24-Stunden-Zellen wieder die höheren Werte. Die Ansätze mit *Spirulina*

platensis Zugabe verhielten sich gleichsinnig. Diese Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

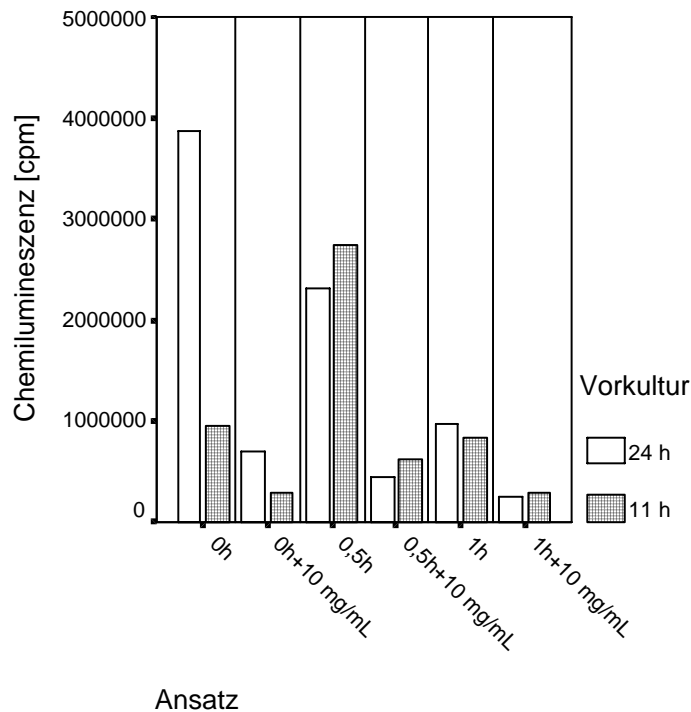


Abb. 24:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] des Stammes CA6 (Vorkulturdauer 11 und 24 h)

4.7.3 Vergleich 3153A und CA6 (Vorkulturdauer 24 h) unter hypheninduzierenden Kulturbedingungen

Die Stämme 3153A und CA6 - jeweils mit einer Vorkulturdauer von 24 Stunden - wurden auf ihre Unterschiede hinsichtlich morphologischer Veränderungen und ROS-Bildung unter hypheninduzierenden Bedingungen untersucht. Bei den Untersuchungen war die Zellzahl mit 10^7 Zellen/mL für beide Stämme gleich. Ohne Inkubation war sowohl für den Stamm 3153A als auch für den Stamm CA6 keine Hyphenbildung zu beobachten. Nach 30 Minuten Inkubation hatte der Stamm 3153A bereits ca. 80 % Hyphen gebildet, der Stamm CA6 allerdings nur ca. 50 %. Bei einstündiger Inkubation war das Verhältnis 100 % Hyphen zu ca. 90 % Hyphen. Der Vergleich der Ergebnisse der Chemilumineszenzmessung bezüglich der ROS-Bildung ([Abb. 25](#)) ergab für die Ansätze ohne *Spirulina platensis* Zugabe in der Blastosporen-Phase für den Stamm CA6 höhere Werte als für den 3153A, in der Phase der Hyphen-Entwicklung und der Hyphen-Phase war das Verhältnis

umgekehrt. Die Ansätze mit *Spirulina platensis* Zugabe verhielten sich gleichsinnig. Diese Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

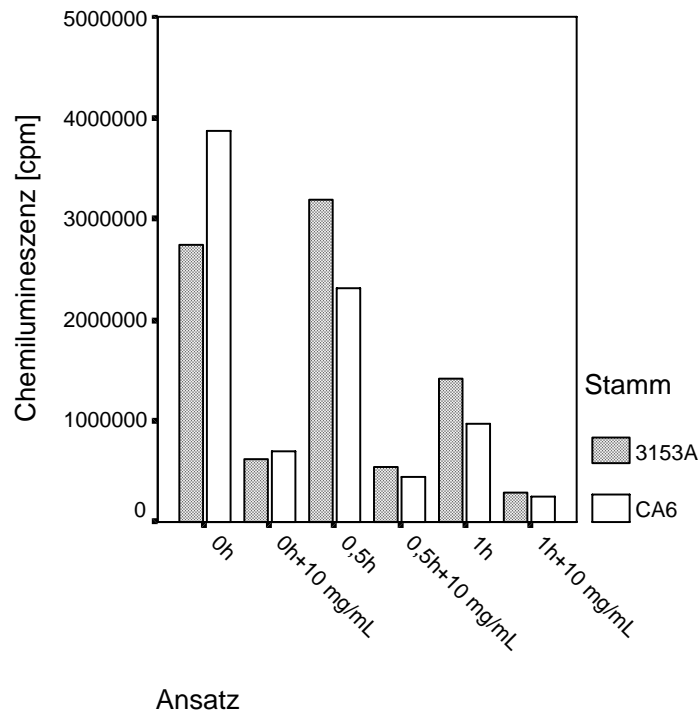


Abb. 25:

Mittelwerte der Chemilumineszenz [cpm] der Stämme CA6 und 3153A (Vorkulturdauer 24 h)

5. Diskussion

Ausgehend von den Beobachtungen von Gorobets et al. (2001) über den wachstumshemmenden Effekt von Spirulina Biomasse auf *Candida albicans* und den Untersuchungen unserer Gruppe (Schröter, 1999; Schröter et al., 2000; Sander et al. 2002) zur ROS-Bildung in *Candida* Spezies, wurde in dieser Arbeit versucht zwischen beiden Phänomenen einen kausalen Zusammenhang herzustellen.

Während einer Infektion ist *Candida* einer Reihe von Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus ausgesetzt. Zu den Mediatoren der Abwehr einer Pilzinfektion gehören u. a. auch die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die von den Phagozyten während des „Ausbruches“ einer gesteigerten Zellatmung (dem so genannten respiratory burst) gebildet werden (Badwey u. Karnovsky, 1980).

Gegen die Wirkung von ROS aus Wirtszellen und gegen selbst gebildete ROS schützt sich *Candida* durch verschiedene Katalasen (Wysong et al., 1998) und durch die Aktivität mehrerer Superoxid-Dismutasen (SOD), den Schlüsselenzymen bei der Inaktivierung der ROS (Cadenas, 1989). Im Zytoplasma von *Candida* sind u. a. eine Kupfer-Zink-SOD (SOD1) und eine Mangan-SOD (SOD3) aktiv, in den Mitochondrien eine Mangan-SOD (SOD2). Im Stadium der Hyphenbildung – wenn Zellatmung (Aoki u. Ito-Kuwa, 1982) und ROS-Bildung (Schröter et al., 2000; diese Arbeit) ihr Maximum erreichen – wird das *SOD5*-Gen, das für eine weitere Kupfer-Zink-SOD kodiert, hochreguliert. In Blastosporen erfolgt eine Induktion des gleichen Gens durch osmotischen und oxidativen Stress. Für alle Induktionen ist die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Rim101p (Rim101-Protein) erforderlich (Martchenko et al, 2004).

Die gleichen Autoren haben die Wirksamkeit des Schutzes vor ROS durch Superoxid-Dismutasen an einer *Candida albicans*-Mutante (UH16-2) mit fehlender *SOD5*-Aktivität nachgewiesen: Diese Mutante ist zwar lebensfähig, zeigt aber in nährstoffarmen Medien eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 . Und in einem Mausmodell für *Candida*-Infektion (Injektion des Pilzes in die Schwanzvene) ist die gleiche *SOD5*-Mangelmutante nicht mehr pathogen (Martchenko et al, 2004).

Das *SOD5*-Protein ist also ein Pathogenitätsfaktor der hyphenbildenden *Candida albicans*. In Übereinstimmung damit, wurden Homologe des *SOD5*-Gens nur bei den

hyphenbildenden (filamentösen) Pilzen *Neurospora crassa* und *Aspergillus fumigatus*, nicht jedoch bei *Saccharomyces cerevisiae* und *S. pombe* gefunden (Martchenko et al., 2004).

Seit den vorangehenden Arbeiten von Schröter (1999), Schröter et al. (2000) und Sander et al. (2002) aus unserer Gruppe wird als neuer Aspekt in der Infektionsbiologie von *Candida albicans* die Möglichkeit diskutiert, dass die ROS-Bildung des Pilzes einen weiteren Pathogenitätsfaktor darstellt, denn sie steht in engem Zusammenhang mit der Hyphenbildung (Morphogenese), die für die Pathogenität des Pilzes essenziell ist (Saltarelli et al., 1975). Es erscheint also möglich, dass sich *Candida albicans* nicht nur durch verstärkte Synthese von SOD-Protein wirksam gegen die ROS aus Wirtszellen schützt, sondern dass sie selbst auch ROS produziert, um hiermit die Wirtszellen zu schädigen und das Eindringen in den Wirt zu erleichtern.

Dieses interessante Szenario eines „Krieges der ROS“ hat an Wahrscheinlichkeit durch den Befund gewonnen, dass das Allylamin-Antimykotikum Terbinafin (Favre u. Ryder, 1996) die ROS-Produktion von *Candida albicans* nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig hemmt (Sander et al., 2002). Die Hemmung nimmt mit steigender Dosis und mit steigender Inkubationszeit zu. Wäre die Hemmung unabhängig von der Inkubationszeit, so läge als rein chemische, unmittelbar ablaufende Reaktion ein ROS-„Scavenging“ vor. Tatsächlich ist Terbinafin mit seiner Kohlenstoff-Dreifachbindung ein bekannter Radikal-„Scavenger“ (Camera et al., 1999). Der Mechanismus der zusätzlichen zeitabhängigen biochemischen Reaktion ist unbekannt. Offenbar ist sie unabhängig von der spezifischen und selektiven Hemmung der Squalen-Epoxidase des Pilzes (Favre u. Ryder, 1996) und betrifft evtl. direkt die Zellatmung des Pilzes.

In diesem Zusammenhang war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen weiteren Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, ob die von *Candida albicans* produzierten ROS als potenzielle Virulenzfaktoren anzusehen sind.

Fußend auf den Befunden von Gorobets et al. (2001), dass *Spirulina* das Wachstum von *Candida* hemmt, war mit lucigenin-verstärkter Chemolumineszenz zu untersuchen, ob *Spirulina*-Biomasse die ROS-Bildung von *C. albicans* dosis- und

evtl. auch zeitabhängig hemmt. Im positiven Fall könnten sich möglicherweise Konsequenzen für eine therapeutische Beeinflussung von Mykosen ergeben.

Für die vorliegende Arbeit wurden im Rahmen einer Testung der Versuchsansätze zunächst frühere Befunde repliziert und gezeigt, dass die Blastosporen der *Candida albicans*-Stämme 3153A und CA6 in YEPD-Medium (Hefeextrakt, Pepton, Dextrose) über 24 Stunden eine typische Wachstumskurve aufweisen; und zwar beginnend mit einer 4-stündigen „Lag“-Phase, gefolgt von exponentiellem Wachstum bis zur Stunde 10, einer nachfolgenden Phase von dezeleriertem Wachstum und einem stationärem Verhalten in den letzten drei Stunden.

Während der Phase des exponentiellen Wachstums nahm das Zellvolumen erst zu und dann wieder ab. Bei beiden Stämmen erreichte die ROS-Produktion (bezogen auf die Zellzahl) nach 6 Stunden, also im ersten Drittel des exponentiellen Wachstums, ihr Maximum und blieb danach unverändert hoch.

Im Hauptteil der Experimente wurden exponentiell wachsende Blastosporen des Stammes 3153A (6 Stunden Vorkultur in YEPD-Medium) in PBS mit steigenden Mengen *Spirulina*-Biomasse (0,01; 0,1; 1 und 10 mg/mL) versetzt und jeweils 0, 30 und 60 Minuten inkubiert. Danach wurde in einer Messkette über 20 Minuten 10-mal die Chemolumineszenz gemessen.

Zu allen drei Zeitpunkten hemmte *Spirulina* konzentrationsabhängig die ROS-Produktion. Die Mittelwerte der Messungen zeigten aber erhebliche Schwankungen, offenbar bedingt durch Fehler bei der Bestimmung der Zellzahlen.

Diese Fehlbestimmungen sind wahrscheinlich Folge von Zellverklumpungen in der Kultur, obwohl dieser Effekt nach Angaben vom Hersteller Schärfe System (2003) keinen Einfluss auf die Zellzahlbestimmung mit ihren Geräten habe.

Eine Proteingehaltsbestimmung hätte eine gegen diese Effekte unempfindliche Bezugsgröße für die ROS-Bildung geliefert.

Es konnte daher im Student-t-Test der Effekt auf die Mittelwerte der Messungen nur für die höchste *Spirulina*-Konzentration statistisch gesichert werden. Mit einer linearen Regressions-Analyse aller Einzelwerte gegen den Logarithmus der *Spirulina*-Konzentration war der Trend jedoch in allen drei Messreihen statistisch hoch signifikant.

Die prozentuale Hemmung durch die vier *Spirulina*-Konzentrationen war zu allen drei Zeitpunkten vergleichbar, d. h., es bestand zusätzlich zur Abhängigkeit von der *Spirulina*-Konzentration keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Im untersuchten System ist also nur ein direkter „Scavenging“-Effekt von *Spirulina*, aber keine indirekte biochemische Einwirkung auf die ROS-Synthese nachweisbar. Durch Ascorbinsäure allein, in einer äquivalenten Menge, wie sie nach Angaben des Herstellers eine 10 mg/mL konzentrierte *Spirulina platensis*-Suspension enthält, wurde die ROS-Bildung zu 70 % gehemmt. Die Hemmung durch 10 mg/mL konzentrierte *Spirulina platensis*-Suspension betrug 94 %. Gegenüber dem Wert mit Vitamin C allein, ist das eine zusätzliche Hemmung um 81 %. *Spirulina* enthält also zusätzlich zur Ascorbinsäure weitere wasserlösliche ROS-„Scavenger“.

Diese Untersuchungen an exponentiell wachsenden Blastosporen (6 Stunden Inkubation in YepeD-Medium) wurden ergänzt durch eine Analyse der *Spirulina*-Wirkung auf Zellen in der Phase der Hyphen-Entwicklung und in der Hyphenphase. Blastosporen der stationären Phase (24 Stunden Inkubation in YEPE-D-Medium) wurden unter hypheninduzierenden Bedingungen (in YEPE-D-Medium mit 10 % FKS) inkubiert. Sie befanden sich dabei nach 30 Minuten im Stadium der Hyphen-Entwicklung. Nach 60 Minuten Inkubation war die Entwicklung der Hyphen abgeschlossen.

Diese Zellen des Stammes 3153A in der stationären Blastosporen-Phase, der Phase der Hyphen-Entwicklung und der Hyphenphase wurden in PBS gewaschen, mit einer *Spirulina*-Konzentration von 10 mg/mL in PBS versetzt und unmittelbar danach gemessen. In allen drei Wachstumsformen wurde die ROS-Bildung zu etwa 80 % gehemmt, also weniger als in den exponentiell wachsenden Blastosporen. Der unter diesen hypheninduzierenden Bedingungen am Stamm 3153A gefundene Effekt von *Spirulina platensis* konnten am Stamm CA6 nach 11 Stunden Vorkultur gleichsinnig nachgewiesen werden.

Die mit PBS hergestellte wässrige Suspension von *Spirulina* zeigte selbst eine geringe und angedeutet konzentrationsabhängige Chemolumineszenz. Die chemische Grundlage dieses Effektes ist ungeklärt. Er zeigt jedoch, dass eine Quenchung der Lumineszenz keinen entscheidenden Einfluss auf die Messergebnisse dieser Arbeit hat.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Befund, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Dauer der Inkubation mit *Spirulina* (0, 30 und 60 Minuten) keinen Einfluß auf das Ausmaß der ROS-Hemmung in Blastosporen von *Candida albicans* hatte: Die wasserlöslichen Inhaltsstoffe dieser Mikroalge bewirkten also nur ein ROS-„Scavenging“. Bisher bekannte ROS-„Scavenger“ von *Spirulina* sind nach den Mitteilungen in der Literatur nicht nur die Vitamine C und E, sondern auch das zur Gruppe der Phycobiliproteine gehörende C-Phycocyanin mit dem wasserunlöslichen Phycocyanobilin (s. Abb.3) als Wirkgruppe (Pintero Estrada et al., 2001).

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben zur Klärung der Frage, ob die von Gorobets et al. beobachtete Wachstumshemmung von *Candida albicans* auf eine direkte Alterierung der ROS-Bildung durch *Spirulina platensis* zurückzuführen ist, keine hinreichende Antwort.

Da das wachstumshemmende Prinzip von *Spirulina* (Gorobets et al., 2001) jetzt in Methanolextrakten angereichert gefunden wurde (Özdemir et al., 2004), ist es nun möglich, diese Frage und damit die Hypothese von der ROS-Produktion als Pathogenitätsfaktor (Schröter et al. 2000) gezielter durch die Verwendung der Inhaltsstoffe aus methanolischen *Spirulina*-Extrakten zu überprüfen.

6. Literatur

- Ansorg R, Kap. 53 Endomykosen. In: Thomas L, Hrsg. 1998, Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 5. Aufl., TH-Books, Frankfurt/M. , S. 1329-1340.
- Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Vidotto V, Takeo K. 2002. Chemoluminescence of superoxide generated by *Candida albicans*: differential effects of the superoxide generator paraquat on a wild-type strain and a respiratory mutant. *Med Mycol* 40: 13-19.
- Arndt U. 2003. *Spirulina*, *Chlorella*, AFA-Algen. Hans-Nietsch-Verlag, Freiburg.
- Badwey JA, Karnovsky ML. 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem* 49: 695-726.
- Berman J, Sudbery PE. 2002. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Rev Genet* 3: 918-930.
- Bhat VB, Madyastha KM. 2000. C-phycoerythrin: A potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Comm* 275: 20-25.
- Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. *Science* 277: 1453-1474.
- Blinkova LP, Gorobets OB, Baturo AP. 2001. Biological activity of *Spirulina platensis*, russ. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (Moscow) no.2: 114-118.
- Bruno VM, Mitchell AP. 2004. Large-scale gene function analysis in *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 157-161.
- Burja AM, Banaigs B, Abou-Mansour E, Burgess JG, Wright PC. 2001. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57: 9347-9377.
- Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Rev Biochem* 58: 79-110.
- Camera E, Cannistraci C, Briganti S, Colombo D, Picardo M. 1999. Scavenging effects of terbinafine on free radicals *in vitro*. *Br J Dermatol* 140: 640-644.
- Casadevall A, Pirofski LA. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67: 3703-3713.
- Chamorro G, Salazar M, Gomes de Lima Araujo K, Pereira dos Santos C, Ceballos G, Fabila Castillo L. 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 52: 232-240.
- Choi W, Yoo YJ, Kim M, Shin D, Jeon HB, Choi W. 2003. Identification of proteins highly expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis. *Yeast* 20: 1053-1060.
- Ciferri O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol Rev* 47: 551-578.
- Cook AH. 1958. The chemistry and biology of yeasts. Academic Press, New York.
- Danley DL, Hilger AE, Winkel CA. 1983. Generation of hydrogen peroxide by *Candida albicans* and influence on polymorphonuclear leukocyte activity. *Infection and Immunity* 40: 97-102.

- Dasgupta T, Banejee S, Yadav PK, Rao AR. 2001. Chemomodulation of carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. Mol Cell Biochem 226: 27-38.
- DiBaise JK, Park FL, Lyden E, Brand RE, Brand RM. 2001. Effects of low doses of erythromycin on the ¹³C *Spirulina platensis* gastric emptying breath test and electrogastrogram: a controlled study in healthy volunteers. Am J Gastroenterol 96: 2041-2050.
- Eremina SS, Lozinov AB. 1981. Hydrogen peroxide release into the medium by growing and resting yeast cells, russ. Mikrobiologija 50(3): 414-417.
- Favre B, Ryder NS. 1996. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. Antimicrobial Agents Chemother 40: 443-447.
- Felte F. 2002. Spirulina – Die Wunderalge. Essen Sie Leben!. Egmont vgs Verlagsges., ohne Ortsangabe.
- Frohne F, Jensen U. 1998. Systematik des Pflanzenreiches. Unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen, 5. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Fuchs S. 2000. Zur Diagnostik der Candida-Mykosen mit ausgewählten kommerziellen Testsystemen. Med. Diss., Jena.
- Gorobets OB, Blinkova LP, Baturo AP. 2001. Stimulating and inhibiting effect of *Spirulina platensis* on microorganisms, russ. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol (Moscow) no. 6: 20-24.
- Hayashi O, Hirahashi T, Katoh T, Miyajima H, Hirano T, Okuwaki Y. 1998. Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 44: 841-851.
- Haynes K. 2001. Virulence in *Candida* species. Trends in Microbiology 9: 591-596.
- Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. 2001. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci (USA) 98: 14637-14642.
- Herdman M, Janvier M, Rippka K, Stanier RY. 1979. Genome size of cyanobacteria. J Gen Microbiol 111: 73-85.
- Hillis DM, Holder MT. 2000. Reconstructing the tree of life. New Technologies for life sciences: A Trends Guide, Elsevier, Amsterdam, S. 47-50.
- Hipler U-C, Schreiber G, Wollina U. 1998. Reactive oxygen species in human semen: investigations and measurements. Arch Androl 40: 67-78.
- Hipler U-C, Wollina U, Mayser P. Chemiluminescence measurements of reactive oxygen species (ROS) generated by different stimulated *Trichosporon* strains. In: Roda A., Pazzagli M., Kricka L.J., Stanley P.E. eds. 1999. Bioluminescence and chemiluminescence. Perspectives for the 21st century. John Wiley & Sons, Chichester, S.307-310.
- Kunk SD. 2003. Wellesley College Science Center, http://www.wellesley.edu/Chemistry/nhk/ppt_cyano/.
- Iwasa M, Yamamoto M, Tanaka Y, Kaito M, Adachi Y. 2002. Spirulina-associated hepatotoxicity. Am J Gastroenterol 97: 3212-3213.

- Johnson A. 2003. The biology of mating in *Candida albicans*. *Nature Reviews / Microbiology* 1: 106-116.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002. *Plant systematics. A phylogenetic approach*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Klepser ME, Ernst EJ, Pfaller MA. 1997. Update on antifungal resistance. *Trends Microbiol* 5: 372-375.
- Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Lau BP, Lewis D, Kuper-Goodman T, Carbone S, Holmes C. 2001. Comparison of liquid chromatography / mass spectrometry, ELISA and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *J AOAC Int* 84: 1035-1044.
- Lee AN, Werth VP. 2004. Activation of autoimmunity following use of immunostimulatory herbal supplements. *Arch Dermatol* 140: 723-727.
- Lee JS, Camilleri M, Zinsmeister AR, Burton DD, Kost LJ, Klein PD. 2000. A valid, accurate, office based non-radioactive test for gastric emptying of solids. *Gut* 46: 768-773.
- Lee Y-K. 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J Appl Phycol* 9: 403-411.
- Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.
- Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol Biol Cell* 15: 456-467.
- Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair PP, Varghese C, Somanathan T, Amma BP, Amma NS, Nair MK. 1995. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr Cancer* 24: 197-202.
- Meyer ME. 1999. *Sonnenkraft mit dem blaugrünen Lichtträger Spirulina*. Windpferd Verlagsges., Aitrang.
- Meyer ME. 2000. *Spirulina, Das blaugrüne Wunder*. Windpferd Verlagsges., Aitrang.
- Meyer ME. 2002. *Spirulina. Wundernahrung der Zukunft*. BoD GmbH, Norderstedt.
- Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C, Pla J. 2001. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* 25: 245-268.
- Odds FC, Gow NA, Brown AJ. 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol* 2: r1009.1-1009.4 (<http://genomebiology.com>).
- Özdemir G, Karabay NU, Dalay MC, Pazarbasi B. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Res* 18: 754-757.
- Palla JC, Busson F. 1969. Carotenoids of *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler (Cyanophyceae). *C R Sci Hebd Seances Acad Sci D* 269: 1704-1707.
- Pennisi E. 2003. Modernizing the tree of life. *Science* 300: 1692-1697.
- Pinero Estrada JE, Bermejo Bescos P, Villar del Fresno AM. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina pratensis* protean extract. *Il Farmaco* 56: 497-500.

- Reddy CM, Bhat VB, Kiranmay G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. 2000. Selective inhibition of Cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 599-603.
- Ramirez D, González R, Merino N, Rodriguez S, Ancheta O. 2002a. Inhibitory effects of *Spirulina* in zymosan-induced arthritis in mice. *Mediators Inflamm* 11: 75-79.
- Ramirez D, Ledon N, Gonzales R. 2002b. Role of histamine in the inhibitory effects of phycoyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators Inflamm* 11: 81-85.
- Romay C, Armesto J, Ramirez D, González R, Ledon N, García. 1998. Anti-oxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 47: 36-41.
- Romay C, Ledon N, Gonzalez R. 2000. Effects of phycoyanin extract on prostaglandin E₂ levels in mouse ear inflammation test. *Arzneimittelforsch* 50: 1106-1109.
- Rossi P, Winkler M: Afa-Algen: Eine Alternative zu Ritalin? ADD-Online, <http://www.adhs.ch/add/afa.htm>
- Sachs L. 1992. *Angewandte Statistik*, 7. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.
- Saltarelli CG, Gentile KA, Mancuso SC. 1975. Lethality of *Candida* strains as influenced by the host. *Can J Microbiol* 21: 648-654.
- Salvesen C. 2003. *Blaugrüne Algen. Supernahrung für Körper und Geist*. Waldthausen / Natura Verlag, Waldthausen.
- Sander CS, Hipler U-C, Wollina U, Elsner P. 2002. Inhibitory effect of terbinafine on reactive oxygen species (ROS) generation by *Candida albicans*. *Mycoses* 45: 152-155.
- Sautier C, Tremolieres J. 1975. Food value of the spiruline algae to man (franz.). *Ann Nutr Aliment* 29: 517-534.
- Schärfe System. 2003. *Vitalitätsbestimmungen in der Zellkultur*. Artikelserie Casy® Technology
- Schröter C. 1999. *Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von Candida albicans – ein potentieller Virulenzfaktor*. Med. Diss., Universität Jena.
- Schröter C, Hipler U-C, Wilmer A, Künkel W, Wollina U. 2000. Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. *Arch Dermatol Res* 292: 260-264.
- Schubert R, Handke H, Pankow H, Hrsg. 1990. *Werner Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland; Band 1: Niedere Pflanzen - Grundband; 3. Aufl., Volk und Wissen, Berlin*.
- Schwartz J, Shklar G, Reid S, Trickler D. 1988. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr Cancer* 11: 127-134.
- Sensen CW, Hrsg. 2002. *Essentials of genomics and bioinformatics*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 11
- Simonsohn B. 2000. *Die Heilkraft der Afa-Alge. Vitalität für Körper und Geist durch ein Ur-Heilmittel*. Goldmann-Taschenbuch, München.
- Soll DR, Morrow B, Srikantha T. 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genetics* 9: 61-65.
- Soll DR. 2004. Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: A unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *BioEssays* 26: 10-20.

- Veerman EC, Nazmi K, Van't Hof W, Bolscher JG, Den Hertog AL, Nieuw Amerongen AV. 2004. Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem J* 381: 447-452.
- Viramontes BE, Kim DY, Camilleri M, Lee JS, Stephens D, Burton DD, Thomforde GM, Klein PD, Zinsmeister AR. 2001. Validation of a stable isotope gastric emptying test for normal, accelerated or delayed gastric emptying. *Neurogastroenterol Motility* 13: 567-574.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 1999. *Fundamentals of biochemistry*. J. Wiley, New York.
- Wartenberg A. 1979. *Systematik der niederen Pflanzen. Bakterien, Algen, Pilze, Flechten. Einführung für Botaniker, Mikrobiologen, Pharmazeuten und Mediziner*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart
- Watanabe F, Katsura H, Takenaka S, Fujita T, Abe K, Tamura Y, Nakatsuka T. 1999. Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J Agric Food Chem* 47: 4736-4741.
- Weisse M, Aronoff SC: *Candida*. In: Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM, eds. 1996. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 15th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, S. 940-944.
- Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* 66: 1953-1961.
- Yang Y-L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 36: 223-228.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Ulrich Jakob Willibald Helmut Fuchs
Geburtsdatum/-ort: 10. 03. 1975 in Kassel
Eltern: Dr. med. Sigrun Fuchs und Jakob Fuchs
Nationalität: deutsch
Familienstand: Verheiratet mit Cláudia Miranda Foca-Fuchs (Chemikerin)
Kinder: Sophia Miranda, geboren 18. 02. 2004

Schulbildung:

1982 -1988 Grundschule und Orientierungsstufe in Göttingen
1988 -1995 Kaiserin-Friedrich-Gymnasium Bad Homburg v.d.H.,
Abschluss Abitur

Sonstiges:

07/1995 – 04/1996 Grundwehrdienst bei der Bundesmarine (Fregatte Emden)
06/1996 Pflegepraktikum Universitäts-Kinderklinik Marburg
09/1996 Pflegepraktikum Marienhospital Stuttgart (Unfallchirurgie)

Studium:

10/1996 Beginn des Medizinstudiums an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
08/1998 Physikum
10/1998 Wechsel an die Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/1999 1. Staatsexamen
08/2001 2. Staatsexamen
09/2001 - 03/2002 Arbeit an der Promotion zum Dr. med.
06/2003 3. Staatsexamen

Famulaturen:

- 02/1999 Praxis für Innere und Allgemeinmedizin
Dr. med. Bernd Hackmann in Cuxhaven
- 10/1999 Mayo General Hospital Castlebar/Irland: Innere Medizin
- 02/2000 Universitäts-Kinderklinik Heidelberg
- 09/2000 Institut für Pathologie der Universität Valencia/Spanien

Praktisches Jahr:

- 04/2002 - 08/2002 Chirurgie am Hospital Universitari „German Trias i Pujol“ der
Universität Autonoma de Barcelona/Spanien
- 08/2002 - 10/2002 Erste Hälfte Innere Medizin am Heartlands Hospital der
Universität Birmingham/England
- 10/2002 - 12/2002 Zweite Hälfte Innere Medizin am University Hospital of
Wales/Cardiff/England
- 12/2002 - 03/2003 Wahlfach Pädiatrie an der Universitäts-Kinderklinik in Jena

Berufserfahrung:

- 07/2003 – 12/2003 AiP am Institut für Klinische Pharmakologie der FSU Jena
(German Pharmacovigilance Study (GPS) Group)
- seit 08/2004 AiP/Assistenzarzt an der Universitäts-Kinderklinik Heidelberg

Heidelberg, den

Ulrich Fuchs

Danksagung

Danken möchte ich:

Herrn Prof. Dr. Uwe Wollina für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die großzügige Ausstattung des Labors.

Frau Dr. Uta-Christina Hipler für ihre Hilfe beim Erlernen der experimentellen Methoden.

Frau Brunhilde Knöll und Frau Doreen Winter für die geduldige Hilfe bei der Überwindung praktischer Laborprobleme.

Herrn PD Dr. W. Künkel vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e. V. in Jena für die Bereitstellung der *Candida albicans* -Stämme 3153A und CA6.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Marion Hippus für die liebevolle Weiterbetreuung und ihre Bereitschaft mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden zu haben.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls meiner Familie, vor allem meiner Mutter und meinem Stiefvater Prof. Dr. Ulrich Langenbeck, für ihre Unterstützung und anregende fachliche Diskussion.

Heidelberg, den

Ulrich Fuchs

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Frau PD Dr. rer. nat. Marion Hippus

Frau Dr. Uta-Christina Hipler

Herr Prof. Dr. Uwe Wollina

Das die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Heidelberg, den

Ulrich Fuchs