

Resistenzen von Pilzen gegen medizinisch relevante Antimykotika

HERBERT HOF

Kurzfassung

Pilze sind Eukarionten, gleich Mensch und Tier. Es gibt deshalb nur wenige geeignete pilz-spezifische Angriffsorte für Antimykotika. Im Gegensatz zur Therapie der bakteriellen Infektionen, für welche eine Vielzahl von Antibiotika zur Verfügung steht, ist die Zahl der Antimykotika für die Therapie von Pilzinfektionen gering. Die wichtigsten Gruppen sind die Polyene, die Azole und neuerdings die Echinocandine. Die selektive Wirkung der Polyene und der Azole beruht auf der Tatsache, dass (fast alle) Pilze Ergosterin anstelle von Cholesterin als wichtigsten Lipidbaustein in ihrer zytoplasmatischen Membran verwenden. Die Echinocandine hemmen die Synthese von Glucan, das in die Zellwand der Pilze eingebaut wird. Die menschlichen Zellen werden dadurch nicht attackiert, weil sie keine Zellwand haben. Das Spektrum der Polyene ist ganz breit (nur wenige resistente Pilze existieren) und sie wirken fungizid auf Schimmel- und Sprosspilze. Sekundäre Resistenzen sind extrem selten. Die Azole haben ebenfalls ein breites Wirkspektrum, wobei sie auf die Schimmelpilze fungizid und auf die Sprosspilze fungistatisch wirken. Sekundäre Resistenzen durch Mutationen im Genom und durch Ausprägung von Efflux-pumpen kommen hier jedoch vor. Umgekehrt haben die Echinocandine ihre Stärke bei der Therapie von Sprosspilzinfektionen, wo sie fungizid wirken, während sie auf Schimmelpilze nur fungistatischen Effekt haben. Resistenzen durch Genmutationen sind im Prinzip möglich, spielen aber praktisch noch keine Rolle. Die Resistenzen von Bakterien sind oft auf genetischen Elementen kodiert, die sich horizontal und vertikal ausbreiten können, so dass Resistenzprobleme schnell zunehmen. Die Resistenzen von Pilzen sitzen nicht auf mobilen Genstrukturen; folglich ist eine ähnliche Entwicklung nicht zu erwarten.

Abstract

Resistance of fungi against medically relevant antifungals.

Both, human and fungal cells are eukaryotic; hence, they are genetically rather similar. This means that there are only few differences that could function as selective targets for antifungals, which can act exclusively on fungal cells but do not hamper human or animal cells. Hence, only rather few antifungals are available in contrast to the large number of antibiotics for the therapy of bacterial infections. The most important groups are the polyenes, the triazoles and the new echinocandins. The selective action of polyenes and azoles is due to the fact that fungal cells (with only few

exceptions) possess ergosterol as the essential lipid component in their cytoplasmatic membrane instead of cholesterol in human cells. The echinocandins inhibit the synthesis of glucan, which is a major constituent of the cell wall of most fungi, whereas human cells do not have such a structure. The spectrum of polyenes is very broad; resistance is rare; their action is fungicidal for moulds as well as for yeasts. Azoles also have a broad spectrum of activity; they are fungicidal only for moulds but fungistatic for yeasts. Secondary resistance may develop due to either mutation in their genome or to activation of efflux pumps. Echinocandins are primarily used for the therapy of yeast infections, where they are fungicidal, whereas their action on moulds is only fungistatic. Resistance due to gene mutations is principally possible but still rather exceptional. Resistance genes of bacteria are often encoded on mobile genetic elements, which might be transmitted horizontally and vertically, so that problems of resistance with bacteria are steadily increasing. In contrast, there are no such mobile genetic elements that could transfer resistance in fungi, so that we will not be confronted by similar problems in the therapy of fungal infections. Fungi are indeed quite different from bacteria.

Autor

Prof. Dr. med. habil. HERBERT HOF, Labor Limbach, Im Breitspiel 15, 69126 Heidelberg, E-Mail: herbert.hof@labor-limbach.de

1 Einleitung

Pilze stehen als Eukarionten dem Menschen phylogenetisch näher als den prokaryotischen Bakterien. Dies bedeutet, dass es sehr viele Ansatzpunkte für Medikamente gibt, die selektiv bei Bakterien einen Stoffwechselprozess hemmen und ihn im Wachstum behindern, ohne dabei auch gleichzeitig die menschliche Zelle zu beeinflussen. Folglich steht in der Medizin eine Unzahl von verschiedenen Antibiotika zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen zur Verfügung. Dagegen gibt es nur relativ wenige Unterschiede zwischen menschlichen und pilzlichen Zellen, die als Ziel für Antimykotika genutzt werden können. Dies ist zum einen die Präsenz einer Zellwand aus Glucan, Mannan und Chitin, zum andern zytoplasmatische Membranen, die Ergosterin

anstelle von Cholesterin enthalten (s. Überblick zum Thema z.B. in Hof 2003).

Somit stehen im Vergleich zur Unmenge an Antimykotika gegen Bakterien eine vergleichsweise geringe Anzahl an Antimykotika zur Behandlung von systemischen Pilzinfektionen zur Verfügung. Pilzinfektionen werden hauptsächlich von *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. und in einigen Fällen auch von Kryptokokken, bestimmten Zygomyceten¹, Fusarien und „Schwärzepilzen“ (Dematiaceen) hervorgerufen. Sie werden sowohl für die Therapie von manifesten Erkrankungen als auch zur Prophylaxe benötigt (Hof 2011). Die Therapie der Erreger von Haut- und Nagelmykosen aus den Onygenales werden hier außer Betracht gelassen.

2 Gruppen von Antimykotika

Im Prinzip gibt es nur drei Gruppen von Antimykotika zur Behandlung von systemischen Mykosen (Tabelle 1). Das 5-Fluorocytosin, welches in die DNS-Synthese der Pilze eingreift, spielt nur eine untergeordnete Rolle, da es nur noch bei ganz wenigen Pilzinfektionen, z.B. einer Kryptokokkeninfektion, indiziert ist. Darüber hinaus stehen noch einige wenige andere Substanzgruppen zur Behandlung von Dermatophyteninfektionen zur Verfügung, die aber hier nicht berücksichtigt werden.

In der Therapie von Pilzinfektionen von Pflanzen sind noch weitere Substanzgruppen, z.B. die Sordarine, im Einsatz. Viel wichtiger als diese sind die Peptaibole oder Peptaibiotica aus *Trichoderma* und anderen Pilzen für die biologische Bekämpfung von Schadpilzen.

Die neuen Echinocandine (Abb. 1) sind eigentlich Naturprodukte. Viele verschiedene Schimmelpilze bilden Pneumocandine, welche wegen ihrer antimykotischen Wirkung den Produzenten im Überlebenskampf gegen die Konkurrenz einen Vorteil verschaffen. In der pharmazeutischen Industrie wurden diesem Grundgerüst diverse Seitenketten angefügt, was die Wirkung noch verstärkte, so dass sogar Schimmelpilze, wie z.B. Aspergillen, attackiert werden können. Diese Substanzen sind nicht wasserlöslich und sind somit nicht über den Intestinaltrakt resorbierbar sondern nur mittels Lösungsvermittler als Infusionslösung zu gebrauchen.

Tabelle 1. Einige medizinisch relevante Antimykotika

Substanzgruppe	Wirkstoffe	Wirkmechanismus
Polyene	Amphotericin B Nystatin	Bindung an Ergosterin
Azole	Clotrimazol Fluconazol Itraconazol Fluconazol Voriconazol Posaconazol Isavuconazol	Hemmung der Produktion von Ergosterin
Echinocandine	Anidulafungin Caspofungin Micafungin	Hemmung der Glucansynthese

Die Polyene gehören in die große Gruppe der Makrolide, d.h. sie sind gekennzeichnet durch einen „großen Ring“ (Abb. 2).

Die große Gruppe der Imidazole wird heute fast nur noch zur topischen Therapie verwendet. Die neuen Triazole (Abb. 3) kann man von ihrer chemischen Struktur her in zwei Gruppen unterteilen, nämlich solche mit einer kurzen und solche mit einer langen Seitenkette.

3 Wirkmechanismen

Echinocandine

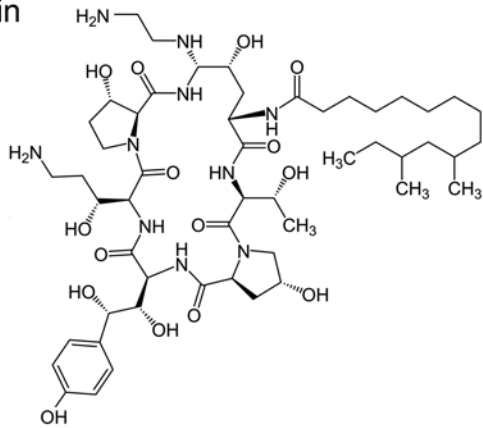
Die Echinocandine binden an das Enzym Glucansynthase, welches in einer menschlichen Zelle kein Pendant hat, weil nur in einer Pilzzelle Glucan zum Aufbau der Zellwand verwendet wird. Folglich gibt es keine Störungen der Physiologie der menschlichen Zelle, d.h. die Verträglichkeit ist sehr gut. Durch das Defizit an Glucan kommt es zu einer Wachstumshemmung bei den Pilzen; da Hyphen von Schimmelpilzen meistens nur an den Spitzen wachsen, kommt es nur dort zu einer Störung. Dagegen ist das Wachstum einer Sprosspilzelle ringsum möglich, so dass erhebliche Störungen der Stabilität der Zellwand auftreten, was zum Tod der Pilzzelle führt. Die Wirkung auf Schimmelpilze ist also im Prinzip fungistatisch, aber auf Sprosspilze fungizid (Hof 2009).

Polyene

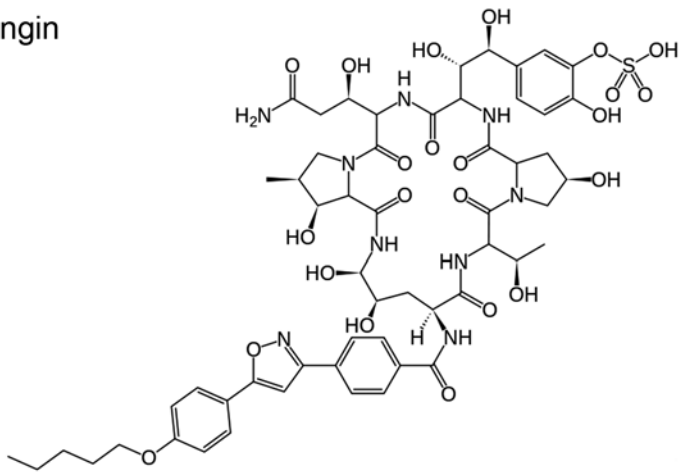
Nach Durchtritt durch die dicke Zellwand der Pilze binden die Polyene an das Ergosterin in

¹ Zygomyceten werden jetzt den Mucoromyceten zugeordnet (vergleiche das System von HIBBETT et al. 2007).

Caspofungin



Micafungin



Anidulafungin

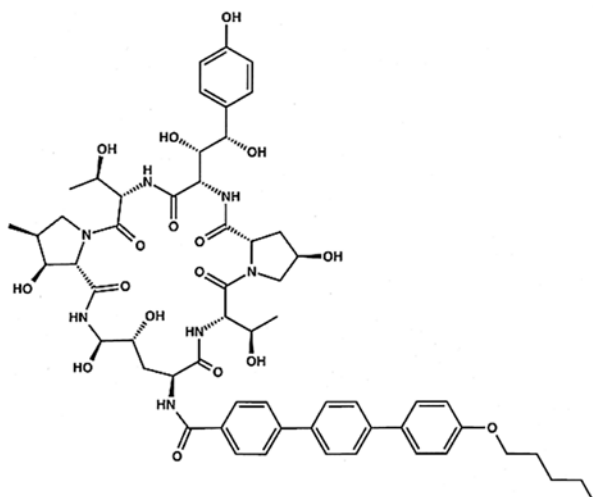
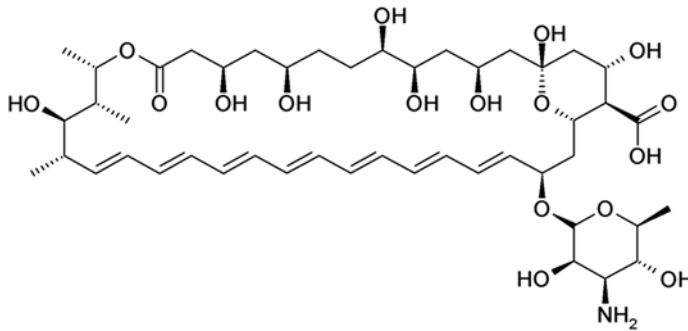
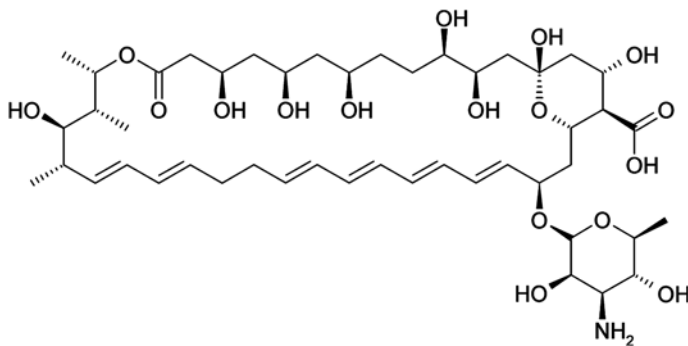


Abbildung 1. Herkunft und chemische Struktur der Echinocandine.



Amphotericin B



Nystatin

Abbildung 2. Chemische Struktur der Polyene.

den zytoplasmatischen Membranen. Mehrere Moleküle aggregieren und bilden einen Kanal, der diese Lipiddoppelschicht durchbohrt. Somit entsteht eine Pore, durch welche die Elektrolyte nach außen dringen. Dann bricht das Membranpotential zusammen und die Zelle stirbt ab. Polyene wirken also im Prinzip rasch fungizid. Sie haben eine ca. 1.000fach höhere Affinität an das Ergosterin als an das Cholesterin in den zytoplasmatischen Membranen menschlicher Zellen. Daraus folgt, dass bei einer hohen Konzentration auch menschliche Zellen unter diesem Medikament leiden. Im Grund ist bei einer für den Pilz notwendigerweise zu erreichenden, optimalen Wirkkonzentration auch schon die Grenze der Verträglichkeit überschritten (Hof 2003).

Azole

Die Azole wirken auf die Pilzzelle fungistatisch, indem sie das für die Produktion von Ergosterin essentielle Enzym 14 α -Demethylase hemmen. Dadurch tritt im Laufe von Stunden und Tagen ein Mangel an diesen notwendigen Lipidbau-

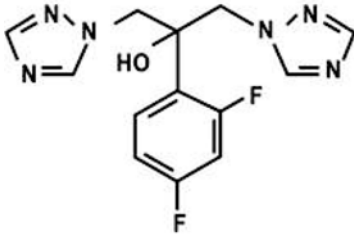
steinen der zytoplasmatischen Membran auf, was nach und nach zu einer Störung der Zellfunktionen und der Vermehrung führt. Zudem häufen sich in der Pilzzelle toxische Vorstufen an, wodurch schlussendlich die Pilzzelle unter Azoleinwirkung abstirbt (Hof 2003). Das Enzym 14 α -Demethylase der Pilzzelle ist verwandt mit den Cytochrom P450 (Cyp)-Enzymen der menschlichen Zellen, z.B. in der Leber. Bei hoher Dosierung kommt es daher evtl. auch zu Nebenwirkungen.

4 Wirkspektren

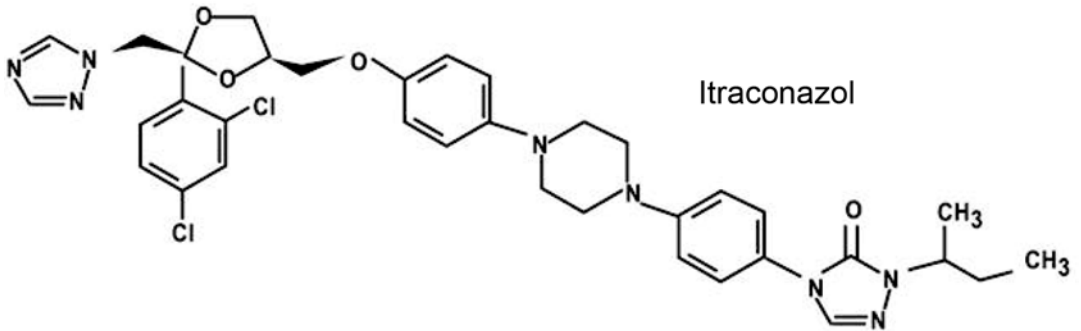
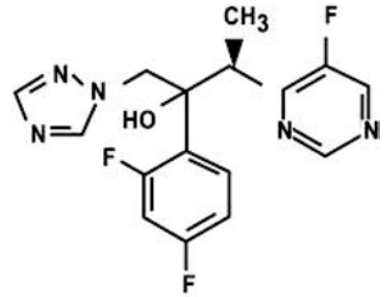
Echinocandine

Der Anteil an Glucan in der Zellwand ist bei verschiedenen Gruppen von Pilzen recht unterschiedlich (Tabelle 2). Generell haben Ascomyeten, z.B. *Candida* spp. und *Aspergillus* spp., einen hohen Glucananteil, weshalb sie recht empfindlich auf Echinocandine reagieren. Die Basidiomyceten und die Zygomyceten sind dagegen von vornherein ziemlich resistent, weil sie

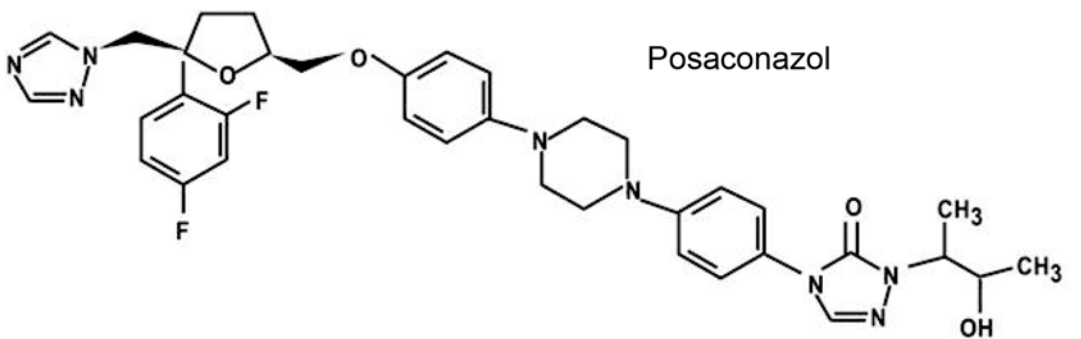
Fluconazol



Voriconazol



Itraconazol



Posaconazol

Abbildung 3. Chemische Struktur der Triazole.

weniger Glucan enthalten und somit die Störung der Synthese kaum Konsequenzen hat (Hof 2009).

Polyene

Diese Antimykotika haben die breiteste Wirkung (Tabelle 2). Nur ganz wenige Pilze sind a priori

dagegen resistent, wie etwa *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus terreus*, *Candida lusitaniae* (Hof 2003).

Azole

Die verschiedenen Azolderivate haben ein unterschiedliches Spektrum. Die meisten *Candida*-Ar-

Tabelle 2. Wirkspektren einiger Antimykotika

	Amphotericin B (Polyen)	Fluconazol (Triazol)	Itraconazol (Triazol)	Voriconazol (Triazol)	Posaconazol (Triazol)	Anidulafungin (Echinocandin)	Micafungin (Echinocandin)	Caspofungin (Echinocandin)
Sprosspilze								
<i>Candida albicans</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Candida glabrata</i>	□	●	●	□	□	■	■	■
<i>Candida tropicalis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Candida parapsilosis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Candida krusei</i>	●	●	●	□	□	■	■	■
<i>Trichosporon asahii</i>	●	●	●	■	■	●	●	●
<i>Cryptococcus neoformans</i>	■	■	■	■	■	●	●	●
Schimmelpilze								
<i>Aspergillus fumigatus</i>	■	●	□	■	■	□	□	□
<i>Aspergillus terreus</i>	●	●	□	■	■	□	□	□
<i>Aspergillus flavus</i>	■	●	□	■	■	□	□	□
<i>Penicillium</i> spp.	■	○	□	■	■	□	□	□
„Schwärzepilze“ (Dematiaceen)	□	○	□	□	□	●	●	●
<i>Fusarium</i> spp.	□	○	○	□	□	○	○	○
Zygomyzeten/Mucorazeen	□	○	○	●	□	○	○	○
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	○	○	○	○	○	□	□	□

■ gut wirksam □ mäßig wirksam ● kaum wirksam ○ unwirksam

ten sind im Allgemeinen hoch empfindlich; es gibt einige Ausnahmen, wie *Candida glabrata* und *C. krusei*. Während Fluconazol ausschließlich nur *Candida*-Arten hemmt, können die neueren Azole, wie Itraconazol und vor allem Voriconazol und Posaconazol darüber hinaus auch gegen einige Schimmelpilze wirken. Bei Zygomyzeten, Fusarien und Dematiaceen wirken sie aber nur mäßig (Hof 2003, 2006).

5 Resistenzmechanismen

Echinocandine

Durch eine Mutation im Hot Spot des Enzyms Glucansynthase wird die Affinität der Echinocandine generell gesenkt, so dass dann die Bindung an das eigentliche Target erschwert wird. Solche Mutanten sind nicht total resistent sondern nur relativ weniger empfindlich. Bei *Candida parapsilosis* ist so eine Genveränderung immer vorhanden, was bedingt, dass diese Stämme eine erhöhte minimale Hemmkonzentration (MHK) aufweisen (Hof 2009). Die Trophozoitenform von

Pneumocystis jirovecii enthält nur wenig Glucan, weshalb dieses Stadium wenig empfindlich ist; dagegen kann die Zystenform durch Echinocandine beeinflusst werden, da in dieser Vermehrungsform große Mengen von Glucan synthetisiert werden (MATSUMOTO et al. 1989).

In geringerem Maße kann die Wirkung der Echinocandine beeinträchtigt werden, wenn ihre Penetration durch die Zellwand aufgehalten wird, z.B. durch Pigmente, wie etwa Melanin. Effluxpumpen erkennen die Echinocandine nicht als Substrat an und spielen folglich keine Rolle.

Polyene

Alle Pilze, die kein Ergosterin in ihrer zytoplasmatischen Membran besitzen, sind a priori resistent gegen diese Antimykotika. Aber solche Pilze sind selten, z.B. *Pneumocystis jirovecii*. Eine Erschwerung des Zugangs zum Ergosterol kann im Prinzip auch zu einem Versagen führen, ist aber nur selten zu beweisen. In Einzelfällen, z.B. bei *Aspergillus terreus*, können Polyene unwirksam sein, ohne dass man dies bis heute plausibel erklären kann (Hof 2003).

Azole

Bislang sind ca. ein Dutzend mutierte Loci im aktiven Zentrum des Enzyms 14 α -Demethylase festgestellt worden, die zu einer Resistenz von Pilzen gegen eines oder mehrere Azole geführt haben (Hof 2006; ARENDRUP et al. 2010; BAHRIE BELLETE 2010). Eine genregulierte Überproduktion des Enzyms kann auch in manchen Fällen zu einer eingeschränkten Wirksamkeit der Azole führen.

Einige resistente Pilze haben Effluxpumpen entwickelt, die in der Lage sind, die Azole aus der Pilzzelle auszuscheiden, noch bevor sie an ihr eigentliches Ziel binden können (Tafel 1, Abb. 4). Die einzelnen Azole sind jedoch unterschiedlich gute Substrate für die diversen Pumpen, so dass meist keine Kreuzresistenzen gegen alle Azolderivate auftreten.

6 Epidemiologie der sekundären Resistenzen

Im Vergleich zu den Bakterien haben Pilze also weniger Resistenzmechanismen; so fehlt vor allem die Fähigkeit, Enzyme zu produzieren, welche die Antimykotika angreifen oder so verändern, dass sie unwirksam würden. Gerade dieser Mechanismus ist für Bakterien die stärkste Waffe gegen Antibiotika, z.B. wenn sie Beta-laktamantibiotika mit Hilfe von Betalaktamasen hydrolysieren.

Besonders wichtig ist die Tatsache, dass eine plasmid- bzw. transposonkodierte Resistenz bei Pilzen bislang im Gegensatz zu Bakterien noch nie aufgetreten ist. Damit ist gesichert, dass eine Ausbreitung von Resistenzen bei Pilzen nicht horizontal erfolgen kann, was ein ganz entscheidender Faktor für die Ausbreitung von bakteriellen Resistenzen ist.

Sekundäre Resistenzen von Pilzen gegen Polyene sind trotz Jahrzehnte langer Anwendung zur Prophylaxe und Therapie von Infektionen des Menschen in der Tat eine Rarität. Während einer längeren Behandlungsdauer können zwar Resistenzen gegen Echinocandine entstehen, jedoch ist dies in der medizinischen Praxis noch nicht von Belang.

Sekundäre Resistenzen bei *Candida*-Arten sind beschrieben, z.B. bei AIDS-Patienten, die über Wochen und Monate wegen eines Soors mit Fluconazol vergeblich behandelt wurden (RUHNKE et al. 2000). Sowohl Mutationen im Gen der 14 α -Demethylase als auch eine

Hochregulierung der Aktivität von Effluxpumpen kann die Ursache dafür sein. Beide Veränderungen stellen jedoch für den betroffenen Pilzstamm ein Handicap dar, wenn der Selektionsdruck durch das Antimykotikum in der Umgebung nachlässt, aber die Fitness reduziert ist. Folglich verschwinden solche resistenten Stämme wieder aus einem Menschen, wenn die Antimykotikumbehandlung aufhört. Dies ist eine weitere Erklärung, warum sich Resistenzen von Pilzen gegen Antimykotika nicht ausbreiten.

Eine primäre Resistenz von *Aspergillus fumigatus* ist sehr selten (PFALLER et al. 2008); in Einzelfällen werden solche Fälle beschrieben, wobei eine Mutation im Enzym der 14 α -Demethylase als Ursache angeführt wurde. Möglicherweise können solche Stämme in der Umwelt des Menschen selektioniert worden sein, da Azole in der Landwirtschaft in großem Umfang zur Bekämpfung von Pilzkrankheiten von Pflanzen eingesetzt werden (Hof 2001). In Ausnahmefällen sind auch bei einer Behandlung des Menschen Azol-resistente Stämme beobachtet worden (ARENDRUP et al. 2010; BELLETE et al. 2010).

7 Fazit

Zur Bekämpfung bakterieller Infektionen des Menschen steht eine Vielzahl von Antibiotika zur Verfügung, da sich die prokaryotische bakterielle Zelle deutlich von der menschlichen eukaryotischen Zelle unterscheidet. Diese Unterschiede ermöglichen eine selektive Wirkung von Antibiotika, ohne dass dabei der Wirt geschädigt wird. Pilzzellen sind hingegen ebenfalls Eukaryoten und bieten deshalb nur wenige mögliche Ansatzpunkte für Antimykotika. Folglich ist die Zahl der Antimykotika klein. Im Gegensatz zu Bakterien gibt es bei Pilzen nur wenige Resistenzmechanismen, nämlich die Veränderung des Targets und die Verhinderung des Zugangs zum Target (Pilze sind nicht in der Lage, durch Enzyme die Medikamente unschädlich zu machen). Insgesamt sind resistente Pilze in der Medizin selten. Die Resistenz von Pilzen breitet sich nicht horizontal durch Plasmide bzw. Transposons aus. Folglich ist eine explosionsartige Zunahme der Resistenzen nicht zu erwarten, auch wenn in der Medizin und in der Landwirtschaft große Mengen davon verwendet werden.

Literatur

- ARENDRUP, M. C., MAVRIDOU, E., MORTENSEN, K. L., SNELDERS, E., FRIMODT-MØLLER, N., KHAN, H., MELCHERS, W. J. & VERWEIJ, P. E. (2010): Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. – PLoS One, **5**: e10080.
- BAHRIE BELLETE, H. R., MOREL, J., FLORI, P., HAFID, J. & MANHSUNG, R. T. (2010): Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. – Medical Mycology, **48**: 197-200.
- HIBBETT, D. S. et al. [67 Autoren] (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. – Mycological Research, **111**(5): 509-547.
- HOF, H. (2001): Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. Antimicrob. – Ag. Chemoth., **45**: 2987-2990
- HOF, H. (2003): Mykologie für Mediziner. – Stuttgart (Thieme Verlag).
- HOF, H. (2006): A new, broad spectrum azole antifungal: posaconazole. Mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. – Mycoses **49**, Suppl. **1**: 2-6.
- HOF, H. (2009): Echinocandine – Wirkspektren und Resistenzen. – Krankenhauspharmazie, **30**: 575-578.
- HOF, H. (2011): Rationaler Einsatz von Antimykotika zur Prophylaxe und Therapie von Sproß- und Schimmelpilzinfektionen. – Chemotherapiejournal, **20**: 94-101.
- HOWARD, S. J., CERAR, D., ANDERSON, M. J., ALBARRAG, A., FISHER, M. C., PASQUALOTTO, A. C., LAVERDIERE, M., ARENDRU, M. C., PERLIN, D. S. & DENNING, D. W. (2009): Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. – Emerg. Infect. Dis., **15**: 1068-1076.
- MATSUMOTO Y., MATSUDA, S. & TEGOSHI, T. (1989): Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. – J. Protozool., **36**: 21S-22S.
- PFALLER, M. A., MESSER, S. A., BOYKEN, L., RICE, C., TENDOLKAR, S., HOLLIS, R. J. & DIEKEMA, D. J. (2008): In vitro survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. – J. Clin. Microbiol., **46**: 2568-2572.
- RUHNKE, M., SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. & MORSCHHÄUSER, J. (2000): Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. – J. Antimicrob. Chemother., **46**: 291-295.
- VERWEIJ, P. E., SNELDERS, E., KEMA, G. H., MELLADO, E. & MELCHERS, W. J. (2009): Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? – Lancet Infect Dis., **9**: 789-795.

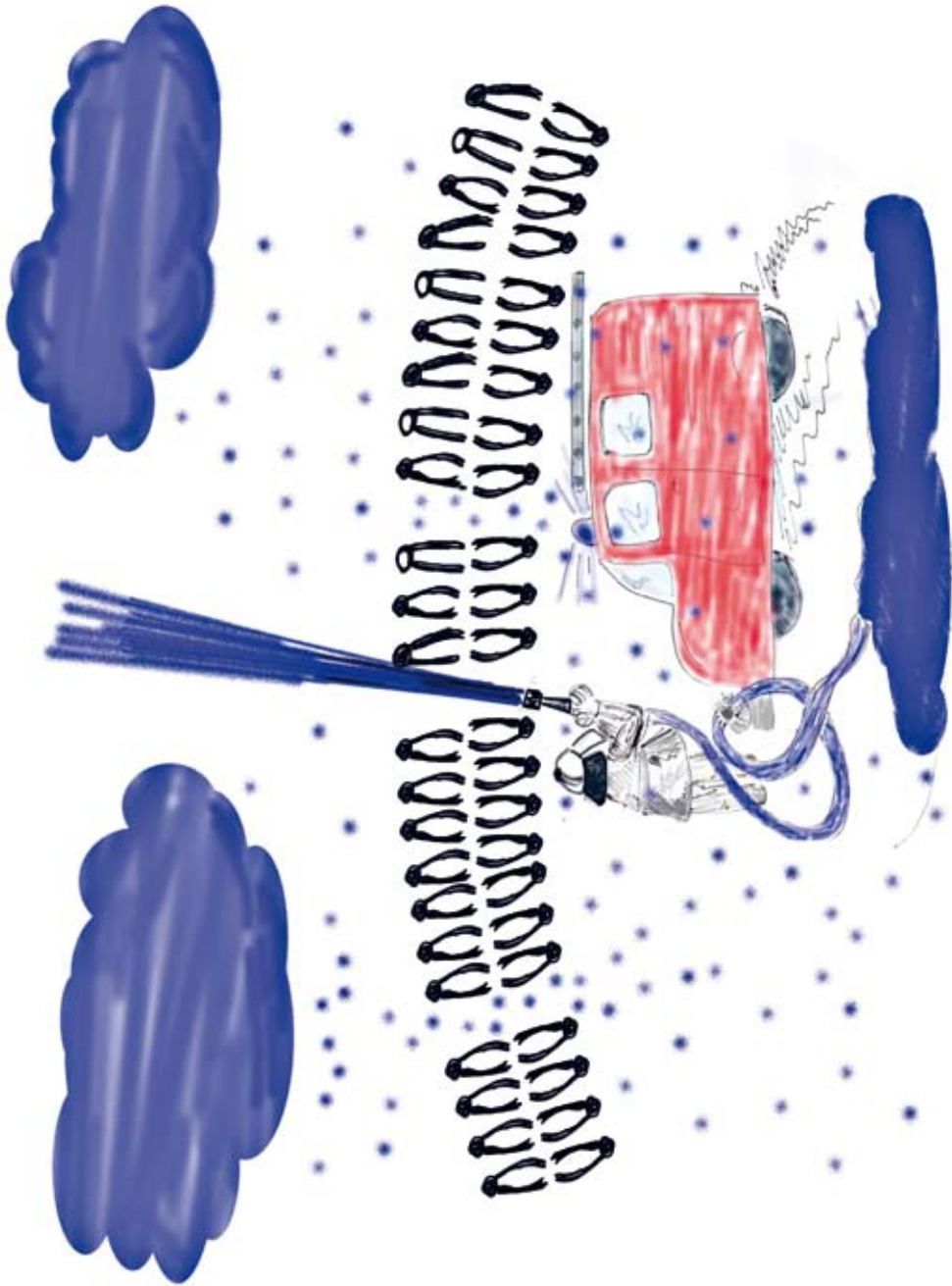


Abbildung 4. Bildhafte Darstellung einer Zelle (Ausschnitt) eines resistenten Pilzes, der Effluxpumpen entwickelt hat. Diese sind in der Lage Azole (blau), die durch die zytoplasmatische Membran (ein Lipidbilayer) ins Zellinnere des Pilzes gelangt sind, auszuscheiden noch bevor sie eine Chance haben, das eigentliche Ziel zu finden.

