

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Untersuchung zur Induktion der Expression des  
Resistenz-vermittelnden MDR1-Effluxpumpen-Gens bei  
Candida albicans**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Timo Hartmann  
aus Kiel**

**2007**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Schumacher

2. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. B. Neumeister

Meinen Eltern

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Candida albicans</i></b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Klinische Bedeutung .....	1
1.1.2. Morphologie .....	2
1.1.3. Zellwand .....	3
1.1.4. Antimykotika .....	4
1.1.4.1. Amphotericin B.....	5
1.1.4.2. Fluconazol.....	5
1.1.4.3. Caspofungin.....	6
<b>1.2. Resistenzmechanismen</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. Membran-Transporter-Systeme von <i>C. albicans</i> .....	7
1.2.1.1. ABC-Transport von <i>C. albicans</i> .....	8
1.2.1.2. MFS-Transporter von <i>Candida albicans</i> .....	9
<b>1.3. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>9</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1. Material</b> .....	<b>11</b>
2.1.1. Kits, Enzyme und Größenstandard.....	11
2.1.2. Geräteliste .....	11
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.4. Synthetische Oligonukleotide.....	12
2.1.5. Stämme .....	12
2.1.6. Kulturmedien und Puffer .....	13
2.1.7. Induktoren.....	14
<b>2.2. Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.2.1. Mikrobiologische Methoden .....	16
2.2.1.1. Anzucht von <i>C. albicans</i> .....	16
2.2.1.2. Basale <i>MDR1</i> -Kinetik.....	16
2.2.1.3. Fluoreszenz-Induktionsassay.....	16
2.2.1.4. Messung der Fluoreszenz-Expression im FACS.....	17
2.2.2. Molekularbiologische Methoden .....	17
2.2.2.1. MasterPure™ Yeast RNA Purification Kits nach Epicentre.....	17
2.2.2.2. Turbo-DNAse-Verdau von Ambion .....	18
2.2.2.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA .....	18
2.2.2.4. Test auf DNA-Kontamination in der isolierten RNA.....	19
2.2.2.5. Reverse Transkription (RT).....	19
2.2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.2.2.7. Agrose-Gel-Elektrophorese.....	21
2.2.2.8. Kombinationstestung Fluconazol-Rifampicin .....	21

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Methodenetablierung</b> .....	<b>22</b>
3.1.1. <i>MDR1</i> -Expressionsmessung durch RT-PCR .....	22
3.1.2. Fluoreszenz-Induktionsassay-Etablierung .....	23
<b>3.2. Fluoreszenz-Induktionsassay</b> .....	<b>25</b>
3.2.1. pH-Werte .....	26
3.2.2. Temperatur .....	26
3.2.3. Salze und Cyclosporin A .....	27
3.2.4. Antimykotika .....	28
3.2.5. Antiparasitika .....	28
3.2.6. Antibiotika .....	28
<b>3.3. <i>MDR1</i>-RNA Expression nach Rifampicin-Induktion (RT-PCR)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4. Quantitative Analyse der <i>MDR1</i>-RNA Expression (FACS)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5. MHK von Fluconazol in Kombination mit Rifampicin</b> .....	<b>32</b>
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1. Nachweis der <i>MDR1</i>-Induktion</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2. Induktoren-Screening</b> .....	<b>35</b>
4.2.1. Einfluss von Determinanten der Genexpression von <i>C.albicans</i> auf die Expression von <i>MDR1</i> .....	35
4.2.2. Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf die Expression von <i>MDR1</i> .....	37
<b>4.3. Rifampicin</b> .....	<b>39</b>
4.3.1. Rifampicin induziert <i>MDR1</i> -RNA .....	40
4.3.2. Rifampicin induziert keine Fluconazol-Resistenz .....	41
<b>4.4. Ausblick</b> .....	<b>42</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>43</b>
<b>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>45</b>
<b>6.1. Einheiten</b> .....	<b>45</b>
<b>6.2. Weitere Abkürzungen</b> .....	<b>45</b>
<b>7. ANHANG</b> .....	<b>47</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>49</b>

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

### 1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist aufgrund des Einsatzes moderner Therapieformen in der Hämato-Onkologie, des Fortschrittes in der Transplantations-, Neonatal- und Intensivmedizin einerseits und durch die Ausbreitung der HIV-Infektion andererseits die Zahl immunkompromittierter Patienten erheblich gestiegen. Da diese Patienten ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung invasiver Mykosen besitzen, kam es in den letzten Jahren zu einer deutlichen Zunahme invasiver Pilzinfektionen. Während vor 20-30 Jahren eine disseminierte Mykose noch eine relativ seltene Erkrankung darstellte, gehören heute *Candida*-Arten mit 9 % neben Enterokokken zu den dritthäufigsten Erregern einer nosokomialen Septikämie [115]. Der häufigste Erreger invasiver Mykosen ist *Candida albicans* [103].

#### 1.1. *Candida albicans*

##### 1.1.1. Klinische Bedeutung

*C. albicans* tritt als Kommensale auf Haut und Schleimhaut von Mensch und Tier auf. So wird *C. albicans* in Abstrichmaterialien der Haut, bei bis zu 30 % gesunder Erwachsener im Oropharynx, im Vaginalsekret und bei bis zu 65 % der Personen im Jejunalsekret nachgewiesen [17].

*Candida*-Infektionen entstehen am häufigsten bei Patienten mit Defekten der unspezifischen und/oder spezifischen Abwehr, vor allem bei Patienten mit gestörter zellulärer Immunität [37, 80]. Daneben können Veränderungen der bakteriellen Normalflora unter intensiver Antibiotikatherapie, hormonellen Umstellungen (Kontrazeptiva, Gravidität), Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus, Adipositas), lokalen Belastungen (Verbrennung, Hämostase) zu einer massenhaften Vermehrung von *Candida spp.* auf Haut und Schleimhäuten und, davon ausgehend, zu Infektionen führen. *Candida*-Infektionen sind in der überwiegenden Mehrzahl endogenen Ursprungs. *Candida spp.* werden zu den opportunistischen Infektionserregern gezählt.

Das Spektrum der durch *Candida spp.* ausgelösten Infektionen reicht von rein lokalen Formen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen

## 1. EINLEITUNG

---

(Tabelle 1). Die Mortalitätsrate systemischer *Candida*-Infektionen beträgt etwa 35 % [112].

**Tabelle 1: Formen der *Candida*-Infektion.**

Mukokutane Form	<ul style="list-style-type: none"><li>• Haut- und Nagelinfektionen</li><li>• Soor (Mund, Vagina)</li><li>• Ösophagitis</li><li>• Balanitis</li></ul>
Systemische Form	<ul style="list-style-type: none"><li>• Candiämie bzw. <i>Candida</i>-Sepsis</li><li>• Hepatolienale Candidiasis</li><li>• isolierter oder disseminierter Organbefall</li></ul>

Der häufigste Erreger invasiver *Candida*-Infektionen ist *C. albicans*. In den letzten Jahren traten jedoch zunehmend auch andere *Candida*-Arten als Erreger in Erscheinung, wie z.B. *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* und *Candida dubliniensis* (Tabelle 2), dennoch bleibt *C. albicans* der klinisch wichtigste Erreger invasiver Mykosen.

**Tabelle 2: Häufigkeit verschiedener *Candida*-Arten in Infektionen (modifiziert nach Gudlaugsson et al, 2003).**

<i>Candida</i> -Spezies	Anteil (%)
<i>C. albicans</i>	68
<i>C. glabrata</i>	18
<i>C. parapsilosis</i>	13
<i>C. tropicalis</i>	10
<i>C. lusitanae</i>	2
<i>C. krusei</i>	2

### 1.1.2. Morphologie

*C. albicans* (lat. *candidus*: glänzend weiß; *albicare*: weiß sein/werden) gehört zu den Spross- oder Hefepilzen. Sprosspilze sind einzellige eukaryote Zellen, die sich durch Sprossung vermehren, d.h. durch Ausstülpung der Zellwand entsteht eine Tochterzelle, in die nach der Kernteilung der Tochterkern einwandert. *C. albicans* vermehrt sich nur ungeschlechtlich und gehört somit zur Klasse der

Fungi imperfecti oder Deuteromycetes. *C. albicans* besitzt einem diploiden Chromosomensatz mit 8 Chromosomen. Das Genom von *C. albicans* ist mittlerweile komplett sequenziert (<http://www.stanford.edu/group/candida>).

*C. albicans* kann zwischen den einzelligen Hefeformen und den mehrzelligen, durch Hyphen gebildeten Myzelformen wechseln. Sphärische, proliferierende Hefezellen findet man überwiegend bei kolonisierenden Zellen, während die durch apikales Wachstum auskeimenden, zylinderförmigen, multizellulären, septierten Hyphen der Myzelform bei der Invasion ins Gewebe auftreten. Der morphologische Übergang von der Hefe zur Hyphe und umgekehrt wird als Dimorphismus bezeichnet und als Virulenzfaktor diskutiert [19].

### 1.1.3. Zellwand

Die zytoplasmatische Membran der Pilzzelle wird wie jede Biomembran von einer Lipiddoppelschicht gebildet. Im Gegensatz zu anderen Eukaryonten zeichnet sich die Pilzmembran jedoch durch den Einbau von Ergosterin statt Cholesterin als Hauptstrukturkomponente aus.

Die Oberflächenarchitektur von *C. albicans* spielt eine wichtige Rolle bei der Umwelt-Wahrnehmung und der Kolonisierung von Wirtsoberflächen. *C. albicans* weist Mechanismen des Molekularen Mimikry auf. Er kann einen Mantel aus wirtshomologen Proteinen produzieren oder wirtseigene Proteine an der Oberfläche binden [63]. Dadurch werden Candida-Zellen vom Immunsystem des Wirtes schlechter erkannt und verbessern so ihre Überlebenschancen.

Die Zellwand von *C. albicans* ist komplex aufgebaut. Sie verfügt über eine Reihe von verschiedenen Liganden, die selektiv an Rezeptorstrukturen der Wirtszellen binden können. Die Adhäsion von *C. albicans* wird z.B. von extrazellulären Integrin-analogen Mannoproteinen [39] oder den an die Gefäßendothelien [25] bzw. an die Makrophagen der Milz und Lymphknoten bindenden Als-Glykoproteine [50] gewährleistet. Weitere Adhäsionsfaktoren sind die myzelzellwandspezifischen Hwp1p-Proteine [97, 98] und die extrazellulären, Matrixbindenden, hydrophoben Oberflächenproteine von *C. albicans* [65, 97].

Die Oberflächenhydrophobizität von *C. albicans* wird von den Wachstumsbedingungen, der Zellmorphologie und der Wachstumsphase beeinflusst und



scheint bei der Entwicklung von chronischen Candidosen von Bedeutung zu sein [33]. So treten *in vitro* bei 23 °C hydrophobe Zellen in der stationären Wachstumsphase auf, während bei 37 °C eher hydrophile Zellen auftreten [44, 45]. Hydrophobe Zellen sind vergleichsweise stärker adhären an Wirtssubstraten wie Mucin, Epithelzellen, Endothelzellen und extrazelluläre Matrix als hydrophile Zellen und besitzen eine verstärkte Phagozytoseresistenz [20, 32, 43].

### 1.1.4. Antimykotika

Für die Therapie von Pilzinfektionen stehen vergleichsweise wenige Substanzen zur Verfügung, da wegen der Ähnlichkeit in Struktur und Stoffwechsel der Pilzzellen mit humanen Zellen (Eukaryonten) bislang nur wenige spezifische Angriffspunkte nutzbar gemacht werden konnten. Die derzeit im klinischen Einsatz befindlichen Antimykotika können in sieben Substanzklassen eingeteilt werden (Tabelle 3), von denen die Polyene (Amphotericin B), die Triazole (Fluconazol, Voriconazol) und die Echinocandine (Caspofungin) die größte Bedeutung in der Therapie von invasiven *Candida*-Infektionen besitzen.

Tabelle 3: Antimykotika- Substanzklassen.

Substanzgruppe	Beispiel	Applikation
<b>Polyene</b>	Amphotericin B, Nystatin, Natamycin	Parenteral
<b>Azole:</b>		
• <b>Imidazole</b>	Clotrimazol, Sertaconazol	Lokal
• <b>Triazole</b>	Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol	Parenteral
<b>Antimetabolite</b>	5-Fluorocytosin	Parenteral
<b>Echinocandine</b>	Caspofungin	Parenteral
<b>Allylamine</b>	Terbinafin, Naftifin	Lokal
<b>Morpholine</b>	Amorolfin	Lokal
<b>Pyridone</b>	Ciclopiroxalmin	Lokal

### 1.1.4.1. Amphotericin B

Amphotericin B besitzt als Polyen eine Grundstruktur aus einem makrozyklischen Lactonring mit 4 - 7 Doppelbindungen. Aufgrund der amphiphilen Molekülstruktur interagiert Amphotericin B mit dem Ergosterol der Zellmembran und führt zu einer Permeabilisierung der Membran. Es kommt zum Durchtritt von zytoplasmatischen Bestandteilen; die Fähigkeit zur Erhaltung des Protonengradienten und die daran gekoppelte Transportprozesse werden blockiert (fungizide Wirkung). Der Einsatz von parenteralem Amphotericin B ist wegen schwerer Nebenwirkungen, insbesondere der Nephrotoxizität, nicht unproblematisch. Durch liposomale Verkapselung der Substanz konnte die Toxizität gemindert und die Verträglichkeit sowie Dosierung gesteigert werden [12]. Amphotericin B stellt immer noch das Basisantimykotikum speziell für Infektionen durch hochresistente Pilze dar.

### 1.1.4.2. Fluconazol

Triazole sind Weiterentwicklungen der Azole, die anstelle des Imidazolrings einen Triazolring enthalten, wodurch die metabolische Stabilität und Affinität an das fungale Cytochrom P-450 erhöht werden. Triazole wirken durch Hemmung der Biosynthese von Ergosterol, einem essentiellen Bestandteil der Zellmembran von Pilzen, fungistatisch. Der Eingriff in die Ergosterol-Biosynthese erfolgt über die Blockierung des Enzyms  $14\alpha$ -Lanosteroldemethylase (*ERG11*), einem Enzym der Cytochrom-P-450-Gruppe, und führt neben dem Mangel an Ergosterol zu einer Akkumulation von Lanosterol und anderen atypischen Sterolen in der Zellmembran. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Membranfunktion. Insbesondere essentielle, membranständige Enzyme, die für Zellwachstum und -teilung notwendig sind, wie z.B. die Chitinsynthase werden gestört [95]. Aufgrund der im Vergleich zu Amphoterin B geringeren Nebenwirkungen hat sich Fluconazol mittlerweile bei nicht neutropenen Patienten als Mittel der ersten Wahl in der Therapie von *Candida*-Infektionen etabliert.

### 1.1.4.3. Caspofungin

Echinocandine wirken inhibierend auf den Glukansynthase-Komplex, einem für den Zellwandaufbau essentiellen Enzymkomplex bei Pilzen. Diese Enzyminhibition führt letztlich zur Zellyse und hat damit bei *Candida* fungizide Wirkung. Caspofungin ist der erste, therapeutisch eingesetzte Glukansynthasehemmer und seit Anfang des Jahres 2001 als Medikament zugelassen. Nach ersten klinischen Studien zeigte sich Caspofungin dem Amphotericin B in der Therapie invasiver *Candida*-Infektionen als mindestens gleichwertig [71]. Daneben macht ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil den Einsatz von Caspofungin für diese Indikation attraktiv [108]. Caspofungin wird in erster Linie bei rezidivierenden Infektionen oder bei Infektionen mit Erregern, die Resistenzen gegen Triazole und Polyene aufweisen, eingesetzt [57].

### 1.2. Resistenzmechanismen

Angesichts der steigenden Inzidenz von invasiven Mykosen, deren häufigste Erreger *Candida*-Arten sind, wirft die parallel zu beobachtende Resistenzentwicklung von *Candida* gegen Antimykotika schwerwiegende therapeutische Probleme auf, da das vorhandene Arsenal an systemisch applizierbaren Antimykotika, wie oben gezeigt, sehr begrenzt ist. Insbesondere Resistenzen gegen das als erste Wahl eingesetzte Fluconazol stellt hier ein klinisch bedeutsames Problem dar. Neben der klinischen Unwirksamkeit einer antimykotischen Therapie, die auch auf Wirtsfaktoren beruht, versteht man unter mikrobiologischer Resistenz eines Erregers eine quantifizierbare Größe, die als MHK (**M**inimale **H**emm**k**onzentration) bestimmt wird. Liegt die MHK eines Erregers über der durch eine Standardgabe erreichbaren Wirkstoffkonzentration im Serum, kann in der Regel nicht mit einem Therapieerfolg des Chemotherapeutikums gerechnet werden. Die mikrobiologische Resistenz wird durch verschiedene mikrobielle Mechanismen verursacht (Tabelle 4). Sie ist abhängig von dem eingesetzten Medikament.

Tabelle 4: Resistenzmechanismen von *Candida albicans*.

Polyene	
• <b>Veränderung des Angriffspunktes</b>	
	- <b>reduzierter Ergosterolanteil</b> [15]
	- <b>alternative Sterole</b> durch einen Defekt der $\Delta^{5,6}$ Desaturase ( <i>ERG3</i> ) [78]
Azole	
• <b>Veränderung des Angriffspunktes</b>	
	- <b>Mutation von <i>ERG11</i></b> : reduzierte Affinität des Enzyms zu Fluconazol [105]
	- <b>Überexpression des <i>ERG11</i>-Genes</b> [64]
• <b>Veränderung des Transports über die Zellmembran</b>	
	- <b>verminderter Influx</b>
	- <b>verstärkter Efflux</b> durch Expression von Membran-Transporter-Systemen (Effluxpumpen): verminderte intrazelluläre Azolkonzentration [35]

## 1.2.1. Membran-Transporter-Systeme von *C. albicans*

Von den oben angesprochenen Resistenzmechanismen wird der Überexpression von Membran-Transporter-Systemen derzeit die größte klinische Bedeutung in der Resistenzentwicklung gegen Fluconazol beigemessen [56]. Bei diesen membrangebundenen Transporter-Systemen werden zwei große Klassen unterschieden, die als gemeinsames Strukturmerkmal 12 transmembrane Helices aufweisen:

1. ABC-Transporter und
2. MFS-Transporter [21].

Einen Überblick über die bei den unterschiedlichen *Candida*-Arten vorkommenden Transporter gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: **Candida Membran-Transporter (modifiziert nach Niimi et al, 2004).**

<b>Candida-Spezies</b>	<b>Efflux-Pumpe</b>	<b>Transporter</b>
<i>C. albicans</i>	<i>CDR1</i>	ABC
	<i>CDR2</i>	ABC
	<i>MDR1</i>	MFS
	<i>FLUI</i>	MFS
<i>C. glabrata</i>	<i>CDR1</i>	ABC
	<i>PDH1</i>	ABC
<i>C. dubliniensis</i>	<i>CDR1</i>	ABC
	<i>CDR2</i>	ABC
<i>C. neoformans</i>	<i>CneMDR1</i>	ABC
	<i>CneAFR1</i>	ABC
<i>C. krusei</i>	<i>ABC1</i>	ABC
	<i>ABC2</i>	ABC

### 1.2.1.1. ABC-Transport von *C. albicans*

ABC-Transporter vermitteln einen aktiven Transport von Substraten über biologische Membranen durch ATP-Verbrauch. Charakteristisch für ABC-Transporter sind zwei ATP-Bindungskassetten. Diese hochkonservierte Domänen von jeweils ungefähr 215 Aminosäuren sind für die Übertragung der Energie aus der ATP-Bindung und -Hydrolyse auf verschiedene physiologische Prozesse essentiell [49]. Die Expression von ABC-Transportern gewährleistet Mikroorganismen eine Adaptation an veränderte Umweltbedingungen. Bei humanen Zellen vermitteln sie wie z.B. das *MDR1* kodierte humane P-Glycoprotein Zytostatika-Resistenz [35]. Homologe Proteine sind in vielen Bakterien und Pilzen, insbesondere auch verschiedenen *Candida*-Arten nachgewiesen worden (siehe auch Tabelle 5). Bei *C. albicans* wurden bis jetzt zehn Gene (*CDR1 bis CDR10*, **Candida Drug Resistance**) identifiziert, die für ABC-Transporter kodieren. Zwei Gene, *CDR1* und *CDR2*, vermitteln bei *C. albicans* eine Resistenz gegen Fluconazol, wobei *CDR1* in Bezug auf die Fluconazol-Resistenz der wichtigere Transporter zu sein scheint. Er wird in der Mehrzahl der Fluconazol-resistenten Isolaten deutlich stärker exprimiert als bei Fluconazol-sensiblen Stämmen [3, 64, 87, 89, 90]. Die Expression dieser Transportsys-

teme wird durch den Transkriptionsfaktor *TAC1* (Transcriptional Activator of *CDR*) reguliert [18].

### 1.2.1.2. MFS-Transporter von *Candida albicans*

MFS-Transporter (Major Facilitator Superfamily) besitzen im Gegensatz zu ABC-Transportern keine ATP-Binde-Domänen. Der Transport erfolgt durch das Membranpotenzial der Zelle und durch den elektrochemischen Protonengradienten. Sie werden deshalb auch sekundär aktive Transporter genannt [21]. Bei *C. albicans* wurden bislang zwei MFS-Transporter identifiziert, die eine Resistenz gegen Fluconazol vermitteln: *MDR1* (Multi Drug Resistance; Synonym: *BEN<sup>r</sup>* für Benomyl-Resistenz) [10, 26] und *FLU1* (Fluconazol resistance) [13]. Der Nachweis gelang durch Auslösen einer Resistenz gegenüber Benomyl und Methotrexat, Substrate von MDR1p, im primär sensiblen Pilz *Saccharomyces cerevisiae* nach Transformation des *MDR1*-Gens. Auf genetischer Ebene konnten sieben *MDR1*-Allele identifiziert werden, die sich durch Punktmutationen unterscheiden und somit zu einem Aminosäureaustausch im Protein führten. Die unterschiedlichen Allele zeigten ein unterschiedliches Resistenzprofil gegen verschiedene Pumpen-Substrate [38].

Die Expression von *MDR1* ist bei *C. albicans* über den Transkriptionsfaktor Cap1p reguliert. Cap1p ist ein bZip Transkriptionsfaktor, der zur AP-1 Familie gehört und neben der Fluconazol-Resistenzentwicklung auch an der Regulation bei oxidativem Stress beteiligt ist [2].

### 1.3. Ziel der Arbeit

Im Gegensatz zu den übertragbaren Resistenzmechanismen von Bakterien spielen in der Resistenzentwicklung gegen Fluconazol bei *C. albicans* die Expression natürlicher Transport-Systeme wie *CDR1* und *MDR1* eine dominierende Rolle. Die physiologische Funktion dieser Transporter ist noch weitgehend unbekannt. Es ist jedoch eine naheliegende und allgemein akzeptierte Vorstellung, dass Transportsysteme einen Mechanismus des Selbstschutzes von Mikroorganismen durch Ausschleusung potenziell toxischer Substanzen aus der

Zelle darstellen. Bestimmte Transporter sind in der Lage mehrere hundert strukturell und funktionell verschiedene Substanzen zu transportieren [116]. In mikrobiologischen Ökosystemen konnte gezeigt werden, dass durch *Pseudomonas* Arten sezernierte Antibiotika in bestimmten pflanzenpathogenen Pilzen (*Botrytis cinerea*) die Expression von ABC-Transportern auslösen [93]. Das Pflanzenschutzmittel Benomyl, oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid und das Zytostatikum Methotrexat, ein Dehydrofolatreduktase-Inhibitor, lösen in *C. albicans* eine Expression von *MDR1* aus [10, 21, 42, 56, 89]. Das bedeutet, dass zumindest *in vitro* Fluconazol-Resistenz in *C. albicans* auch durch Exposition von nicht primär als Antimykotika eingesetzten Substanzen ausgelöst werden kann. Es ist bislang völlig unklar, ob derartige Phänomene auch *in vivo* von Bedeutung sind.

Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung invasiver Mykosen, erhalten in der Regel aufgrund ihrer Grunderkrankungen eine Vielzahl von chemotherapeutischen Medikamenten (Antibiotika, Antiparasitika, Zytostatika u.a.). Es wäre denkbar, dass durch therapeutischen Einsatz dieser Substanzen bei mit *Candida albicans* besiedelten Patienten eine Expression von Transportsystemen induziert, die sekundär Fluconazol-Resistenz auslösen.

Es war Ziel dieser Arbeit, ein breites Spektrum an Substanzen, die klinisch bei Risikopatienten eingesetzt werden, auf ihr Potenzial zur Induktion von *MDR1* in *C. albicans* zu prüfen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Material

##### 2.1.1. Kits, Enzyme und Größenstandard

MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit	Epicentre, Wisconsin, USA
Qiagen RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Quiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNAse-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
SuperScript II Reverse Transcriptase (10 000 U/μL)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -Polymerase	Roche, Mannheim
Turbo DNase Kit	Ambion, Austin Texas, USA
Turbo RNeasy Kit	Ambion, Austin Texas, USA
1 Kb Plus DNA Ladder	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe

Alle Kits wurden gemäß den Protokollen der Hersteller verwendet. Alle Enzyme wurden in denen vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt.

##### 2.1.2. Geräteliste

Siehe Tabelle 22 im Anhang auf Seite 47.

##### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Siehe Tabelle 23 im Anhang auf Seite 47.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Zur Amplifikation von DNA wurden die in Tabelle 6 aufgeführten, synthetischen Oligonukleotide eingesetzt, die von Sigma-ARK, Sinsheim synthetisiert wurden.

**Tabelle 6: Oligonukleotide.**

<b>Primer (Target)</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Produkt</b>	<b>Referenzen</b>
<i>ACT1Ca-fd</i>	ACTTTTAATGTTCCAGCTTTCTACG	1827 bp	[106]
<i>ACT1Ca-rv</i> ( <i>ACT</i> )	CTTTCATAGAAGATGGAGCCAA		
<i>EFB1-fd</i>	AGTCATTGAACGAATTCTTGGC	625 bp gen. DNA, 260 bp cDNA	[60, 99]
<i>EFB1-rv</i> ( <i>EFB1</i> )	ATCAACTTCATCATCAGAACCG		
<i>BENrA fd</i>	TTTGGTTCATGTGTATCATTCTGG	399 bp	[26, 99]
<i>BENrA rv</i> ( <i>MDR1</i> )	GAATATAAATAAAGGCAGCAATGAC		

Der Elongationsfaktor B1 (*EFB1*) wird ebenso wie Aktin (*ACT*) als Haushaltsgene in vitalen *C. albicans*- Zellen konstitutiv exprimiert [61, 92]. Im Gegensatz zum Aktin enthält das *EFB1*-Gen ein 365 bp großes Intron, so dass in der PCR genomische Amplifikate (DNA) von cDNA-Amplifikaten unterschieden werden können. Beide Gene wurden zum Abgleich der PCR-Banden verwendet. Das Target der *BENrA*-Primer ist *MDR1*. Sie dienen dem Nachweis der *MDR1*-Expression.

### 2.1.5. Stämme

Als Referenzstamm diente *Candida albicans* SC5314. Für den Fluoreszenz-Induktionsassay wurden zwei Reporterstämme (CAG48A, CAG48B, Derivate von SC5314) verwendet, bei denen jeweils auf einem Allel das GFP-Gen (Green Fluorescence Protein) unter die Kontrolle des *MDR1*-Promotors gesetzt worden war. Beide Stämme wurden freundlicherweise von Prof. J. Morschhäuser, Würzburg zur Verfügung gestellt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

Das Stammpaar  $G_{\text{sen}}$  und  $G_{\text{res}}$  wurde konsekutiv bei einem AIDS-Patienten isoliert mit rezidivierender oropharyngealer Candidose isoliert.  $G_{\text{sen}}$  exprimiert das Effluxpumpen-Gen *MDR1* unter normalen Umständen in nur niedrigen Mengen und erscheint Fluconazol-sensibel. Die Fluconazol-Resistenz von  $G_{\text{res}}$  beruht dagegen überwiegend auf einer konstitutiven Überexpression von *MDR1*.  $G_{\text{res}}\Delta\text{mdr1}$  ist ein aus  $G_{\text{res}}$  entwickelter *MDR1*-Knockout-Stamm, der ausser der Expression von *Mdr1p* alle genetischen Merkmale von  $G_{\text{res}}$  aufweist (Tabelle 7). Alle Stämme wurden bei - 80° C in Glycerol aufbewahrt.

**Tabelle 7:** *C. albicans*-Stämme.

Stamm	Beschreibung	Referenzen
SC5314	Referenz-/Wildtyp-Stamm, klinisches Isolat	[28, 31]
CAG48A CAG48B	Derivate von SC5314, GFP-Reporterstamm, GFP-Gen unter Kontrolle des <i>MDR1</i> -Promotors	Morschhäuser, Würzburg
$G_{\text{(sen)}}$ (G2)	Klinisches Isolat, Fluconazol-sensibel	[29]
$G_{\text{(res)}}$ (G5)	Klinisches Isolat, Fluconazol-resistent durch konstitutive <i>MDR1</i> -Überexpression $G_{\text{(res)}}$	
$G_{\text{res}}\Delta\text{mdr1}$ (G5M432)	<i>MDR1</i> -Knockout-Mutante von G	[114]

### 2.1.6. Kulturmedien und Puffer

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien für *C. albicans*. Außerdem ist aus der Tabelle die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ersichtlich.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 8: Kulturmedien und Puffer.**

Medium/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
YNB-Medium	Yeast-Carbon-Base (BD) 2 % Glucose	Standardisiertes Vollmedium (Bouillon) für Expressionsversuche
Hefe-Genta-Agar (HGA)	0,5 % Yeast Extrakt (BD) 1 % Bacto Peptone (BD) 2 % Dextrose 1,5% Agar (Merck) 0,004 % Gentamicin (Serva)	Vollmedium (Festmedium) zur Subkultivierung
TES-Puffer	10 mM Tris-Cl pH 7,5 10 mM EDTA 0,5 % SDS	

### 2.1.7. Induktoren

Für die *MDR1*-Induktion von *C. albicans* wurde als bereits bekannter Induktor Benomyl [10, 26] in einer Konzentration von 50 µg/mL verwendet. Weiterhin wurden Salze, antimikrobielle Substanzen und Lösungsmittel auf ihre Fähigkeit zur Induktion von *MDR1* untersucht und mit Benomyl verglichen. Für antimikrobielle Substanzen wurden sowohl pharmakologisch relevante Serumkonzentrationen als auch superphysiologische Konzentrationen getestet (Tabelle 9, Tabelle 10). Alle Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma bezogen.

**Tabelle 9: Induktoren.**

Substanz	Lösungsmittel	Konzentrationen in mM	Referenzen
Benomyl	DMSO	50 µg/ml	[10]
CaCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	0,3; 3; 30; 60	
FeCl <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	0,01; 0,1; 1	[76]
MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	0,01; 0,1; 1	
MnCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	0,01; 0,1; 1	
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	0,01; 0,1; 1	

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 10: Antimikrobielle Substanzen.

Gruppe/ Substanz	Lösungs- mittel	Konzentrationen in µg/mL		Referenzen
		pharmakol.	verwendete	
<b>Antibiotika</b>				
Penicillin	H <sub>2</sub> O	1,7 - 240	200; 300	[36]
Gentamicin	H <sub>2</sub> O	4 - 10	10; 15	[54, 100]
Erythromycin	EtOH	1- 7,3	4; 8	[62, 67, 100]
Clindamycin	H <sub>2</sub> O	12 - 18	10; 20; 50	[84]
Fusidinsäure	H <sub>2</sub> O	20 - 30	15; 30	[100]
Metronidazol	EtOH	13 - 15	10; 50	[93]
Rifampicin	DMSO	4 - 14	5; 10; 20; 40	[100]
<b>Antimykotika</b>				
Amphotericin B	H <sub>2</sub> O	1,2 - 2,5	0,5; 1,5; 2,5; 5,6	[110]
Caspofungin	H <sub>2</sub> O	> 1	0,5; 1, 2	[59]
Voriconazol	H <sub>2</sub> O	25	25; 50	[83]
<b>Antiparasitika</b>				
Praziquantel	DMSO	> 0,3	0,3; 0,6; 1,2; 3,0	[52, 53]
Albendazole	DMSO	2	2; 4	[48]
Thiabendazole	H <sub>2</sub> O	480	100; 500; 1000	[73]
Spiramycin	Ethanol	5	5; 50	[74]
Sulfadiazin	H <sub>2</sub> O	50	50; 100	[48]
<b>Zytostatika</b>				
Cyclosporin A	Ethanol	> 0,2	0,1; 0,3; 3,0	[79]

Weiterhin wurde der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte (pH 1 bis pH 9) durch entsprechende Einstellung des Induktionsmediums mit HCl oder NaOH sowie die *MDR1*-Expression bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 27 °C, 30 °C, 40 °C, 45 °C, 54 °C) getestet.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Mikrobiologische Methoden

##### 2.2.1.1. Anzucht von *C. albicans*

Die bei - 80° C in Glycerol auf Plastikkügelchen tiefgefrorenen Stämme wurden auf HGA-Medium ausgesät und über Nacht bei 30° C inkubiert. Die bewachsenen Kulturen wurden bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert und maximal dreimal subkultiviert.

Für alle Versuche wurde zunächst in einem 100 mL Erlenmeyer-Kolben eine Vorkultur angesetzt. Eine Einzelkolonie wurde in 30 mL YNB abgeimpft und über Nacht (ca. 12 bis 14 h) in einem auf 30 °C vorgeheizten Schüttler bei 190 RPM inkubiert. Dieses Vorgehen stellte eine optimale Sauerstoff-Durchmischung der Kulturen sicher und verhinderte ein Sedimentieren der Zellen. Die gut bewachsene Vorkultur wurde anschließend für die Hauptkultur 1:10 in warmem YNB-Medium verdünnt und weitere 4 h bei 30 °C unter Schütteln bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert.

##### 2.2.1.2. Basale *MDR1*-Kinetik

Vom Referenzstamm SC5314 wurde aus der Hauptkultur zu definierten Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h) Proben entnommen, die sofort in einem Ethanol-Trockeneisgemisch tiefgefroren und im dann bis zur RNA-Extraktion bei - 80° C gelagert wurden.

##### 2.2.1.3. Fluoreszenz-Induktionsassay

Die bewachsene Hauptkultur mit dem Reporterstamm CAG48A wurde mit der jeweiligen Testsubstanz versehen und weiter unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach jeweils 1 h, 2 h, 4 h und 24 h wurde ein Aliquot der Kultur entnommen und im Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM RE HC) unter Blaulicht auf Präsenz von grün fluoreszierenden Zellen geprüft. Zum Vergleich diente eine mit Benomyl (50 µg/mL) induzierte Probe.

### 2.2.1.4. Messung der Fluoreszenz-Expression im FACS

Die quantitative Analyse der *MDR1*-Expression erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) am GFP-Reporterstamm CAG48A. Die Hauptkultur wurde mit Rifampicin (5, 10, 20, 40 µg/mL) inkubiert. Nach 2 h wurden die Kulturen zentrifugiert (4 min, 10.000 RPM), die Pellets in PBS gewaschen, resuspendiert und nach Zählung in einer Neubauer-Zählkammer auf  $1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Diese Zellsuspension wurde anschliessend im FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Bioscience) analysiert. Als Kontrollen wurden nicht induzierte Zellen als Negativ-Kontrolle, DMSO und Benomyl-induzierte Zellen (50 µg/mL) als Positiv-Kontrolle mitgeführt. Um die Daten zu bestimmen und zu bearbeiten, wurden die Proben mit der CELLQuest ProSoftware (BD Bioscience) ausgewertet.

### 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

Um Bildung von *messenger*-RNA (mRNA) zu bestimmen, wurde die Methode der Reversen Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt.

Da RNasen ubiquitär verbreitet sind und RNA relativ instabil ist, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Isolierung und RT wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser verwendet, um die enthaltenen RNasen zu inaktivieren. Weiterhin wurden sämtliche Arbeitsflächen, sowie potentiell kontaminierte Materialien mit RNase-Away (MBP, Molecular Bio Products) gereinigt. Weitere Maßnahmen, um die Degradierung der RNA zu vermeiden, war das Tragen von Handschuhen, die ausschließliche Verwendung von gestopften, RNasefreien Spitzen sowie von frischen, nicht-autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen.

#### 2.2.2.1. MasterPure™ Yeast RNA Purification Kits nach Epicentre

1,0 mL der Kultur wurde bei 10.000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5417R) und 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit 1 µL Proteinase K (50 µg/µL) und 300 µL

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

Extraktions-Reagenz für 10 s auf dem Vortex gründlich gemischt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 70 °C inkubiert und dabei alle 5 min gevortext. Im Anschluss wurde der Ansatz 5 min auf Eis abgekühlt, mit 175 µL MCP Protein Präzipitations-Reagenz für 10 sec auf dem Vortex gemischt und danach mit 10.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 500 µL Isopropanol hinzugefügt und das Reaktionsgefäß 30 - 40 mal invertiert, bis sich alles aufgelöst hatte. Nach erneuter Zentrifugation (10.000 g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet zweimal mit 500 µL Ethanol (70 %) gewaschen und für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Nach Abnahme der Ethanolphase wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 35 - 50 µL DEPC Wasser aufgelöst und im Photometer vermessen.

### 2.2.2.2. Turbo-DNase-Verdau von Ambion

50 µL der RNA-Lösung wurden mit 5 µL TurboDNasePuffer und 1 µL Turbo DNase (2 U/µL) gemischt und für 30 - 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden dem Ansatz anschließend 5 µL DNase-Inaktivierungs-Reagenz hinzugefügt und der Ansatz für 2 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mixen inkubiert. Zur Trennung der gebundenen DNase von der RNA-Lösung wurde der Ansatz bei 10.000 g für 1,5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches DNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt.

### 2.2.2.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Kontrollmessung bei 280 nm bestimmt. Eine Absorption ( $A_{260\text{nm}}$ ) von 1 entspricht einer Konzentration an einzelsträngiger Nukleinsäure von 40 µg/mL. Die Reinheit und Qualität der RNA-Präparation wurden anhand des Quotienten der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) abgeschätzt. Es wurden nur

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

Proben mit Quotientenwerten zwischen 1,8 und 2,1 weiter bearbeitet. Ein Quotientenwert kleiner 1,8 wurde als Kontamination mit Proteinen interpretiert.

### 2.2.2.4. Test auf DNA-Kontamination in der isolierten RNA

Eine DNA-Kontamination der Proben wurde durch eine PCR mit *EF1B*-Primern über 30 Zyklen in einer RNA-Lösung (1 µg/100 µL) ausgeschlossen. Nur Proben, bei denen kein PCR-Produkt in der RNA-Präparation nachweisbar war, wurden in der RT-PCR weiter analysiert.

### 2.2.2.5. Reverse Transkription (RT)

Die cDNA-Synthese wurde gemäß Herstellerangaben mit dem Superscript™ II Reverse Transcriptase Preamplification System durchgeführt. Die Reverse Transkription dient zur Herstellung von cDNA. Für diesen Zweck wurden 1 µg RNA und 1 µL Oligo(dT)-Primer mit entsprechenden Volumina DEPC-H<sub>2</sub>O (10 µL Gesamtvolumen) gemischt, 10 min bei 65 °C inkubiert, zentrifugiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µL des Mastermixes (Tabelle 11) erfolgte die Amplifikation für 60 min bei 42 °C im vorgeheizten Heizblock sowie anschließend die Enzyminaktivierung für 5 min bei 95 °C. Die entstandene cDNA wurde mit 80 µL DEPC-Wasser (1:5) verdünnt und bei -20 °C bis zu weiteren Verarbeitung gelagert.

**Tabelle 11: RT-Masermix pro Reaktionsgefäß.**

5x First-Stand-Buffer	4 µL
Rnase-Out	1 µL
DTT 0,1 M	2 µL
Nukleotide 10 mM	2 µL
Super Script II Reverse Transcriptase 200 U	1 µL
gesamt	10 µL



### 2.2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Vergleich der Genexpression wurden als Referenz die Expression der Haushaltsgene (*ACT*, *EF1B*) bestimmt. Bei allen cDNA-Proben wurde zunächst eine zyklenarme PCR der Haushaltsgene durchgeführt und die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetragen (Doppelansatz). Die Intensität der Banden wurden mit dem BioDocAnalyzer (Biometra) gemessen, abgeglichen und ein zweiter PCR-Lauf der Haushaltsgene mit der abgeglichenen cDNA durchgeführt. Erst bei Erreichen der gleichen Bandenintensität erfolgte die Expressionsanalyse durch die spezifische PCR (*MDR1*). Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 12, die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 13 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von *C. albicans*, als Negativkontrolle Wasser mitgeführt.

Tabelle 12: PCR-Reaktionsansatz.

	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration	Reaktionsvolumen ( $\mu\text{L}$ )
<b>10X Puffer</b>	10x	1x	2,5
<b>dNTPs (mM)</b>	10	0,2	0,5
<b>Primer (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	25	0,5	1
<b>Template (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	cDNA bzw. DNA	individuell	2,5
<b>Taq Pol (U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	5	0,02	0,1
<b>H<sub>2</sub>O</b>			Ad 25

Tabelle 13: PCR-Programme.

	Temperatur		Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C		5 min
Denaturierung	95 °C		30 sec
Annealing	<i>MDR1</i>	52 °C	30 sec
	<i>EF1B</i>	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C		<i>MDR1</i> 40 sec
	72 °C		<i>EF1B</i> 60 sec
Terminale Extension	72 °C		7 min

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

Die Amplifikationen wurden im T3 ThermoCycler von Biometra® durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden dann bei - 20 °C eingefroren.

### 2.2.2.7. Agarose-Gel-Elektrophorese

Das Auftrennen der PCR-Produkte erfolgte in einem Agarose-Gel (1,5 %). Die PCR-Produkte wurden 1:10 mit OrangeG Ladepuffer versetzt und 8 µL auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 80 Volt (Feldstärke 5 V/cm). Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE. Wenn die DNA ausreichend weit gelaufen war (45 - 90 min), wurde das Gel in Ethidiumbromid (1 µg/mL in A. dest.) gefärbt, im Wasserbad entfärbt und unter UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) ausgewertet. Zur Größen- bzw. Mengenbestimmung der Fragmente in den Proben wurden 5 µL eines DNA-Längenstandards mitgeführt.

### 2.2.2.8. Kombinationstestung Fluconazol-Rifampicin

Die Kombinationstestungen Fluconazol-Rifampicin wurden nach dem NCCLS-Protokoll (M 27-A) durchgeführt. Eine 24 h-Kultur des Teststammes wurde in Aqua dest. densitometrisch auf die Dichte eines McF 0,5 Standards eingestellt und 10 µL der Suspension in 10 mL RPMI 1640 (gepuffert mit MOPS, 0,2% Glukose, pH 7,0) überführt und gründlich gemischt. Die Testung erfolgte in Mikrotiterplatten (U-Form, Nunc). Pro well wurden je 50 µL Rifampicin- und 50 µL Fluconazol-Lösung bzw. RPMI vorgelegt und mit 100 µL Pilzsuspension beimpft. Die Platten wurden 48 h bei 37 °C inkubiert und danach photometrisch bei 600 nm abgelesen.

Als Minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde eine 50 %ige Inhibition, ablesbar als 50 %-Reduktion der optischen Dichte im Vergleich zur Wachstumskontrolle interpretiert.

### 3. ERGEBNISSE

---

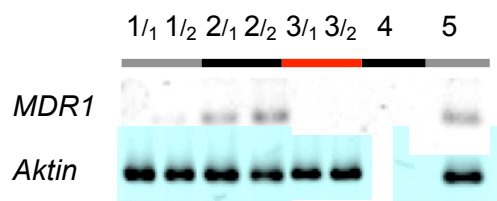
#### 3. Ergebnisse

Es war Ziel dieser Arbeit, ein breites Spektrum an Substanzen, die klinisch bei Risikopatienten eingesetzt werden oder die Einfluss auf die Genexpression bei *C. albicans* besitzen, auf ihr Potenzial zur Induktion von *MDR1*, durch die eine Fluconazol-Resistenz vermittelnde Effluxpumpe kodiert wird, in *C. albicans* zu prüfen. Für die Austestung der breiten Reagenzienpalette wurde ein Fluoreszenz-Induktionsassay etabliert, eine *MDR1*-Induktion durch RT-PCR bestätigt und mittels FACS-Analyse quantifiziert.

#### 3.1. Methodenetablierung

##### 3.1.1. *MDR1*-Expressionsmessung durch RT-PCR

Zur Bestätigung einer Expression von *MDR1*-spezifischer RNA im Fluoreszenz-Induktionsassay wurde eine RT-PCR etabliert. Die Spezifität des Protokolls wurde mit *Candida*-Stämmen überprüft, die hinsichtlich ihrer *MDR1*-Expression definiert waren (Abbildung 1). Es zeigte sich, dass mit diesem Protokoll die *MDR1*-spezifische RNA-Expression des konstitutiv exprimierenden Stammes  $G_{res}$  nachweisbar war und keine Signale beim Wildtypstamm  $G_{sen}$  und der *MDR1*-K.o.-Mutante  $G_{res}\Delta mdr1$  detektiert wurden.



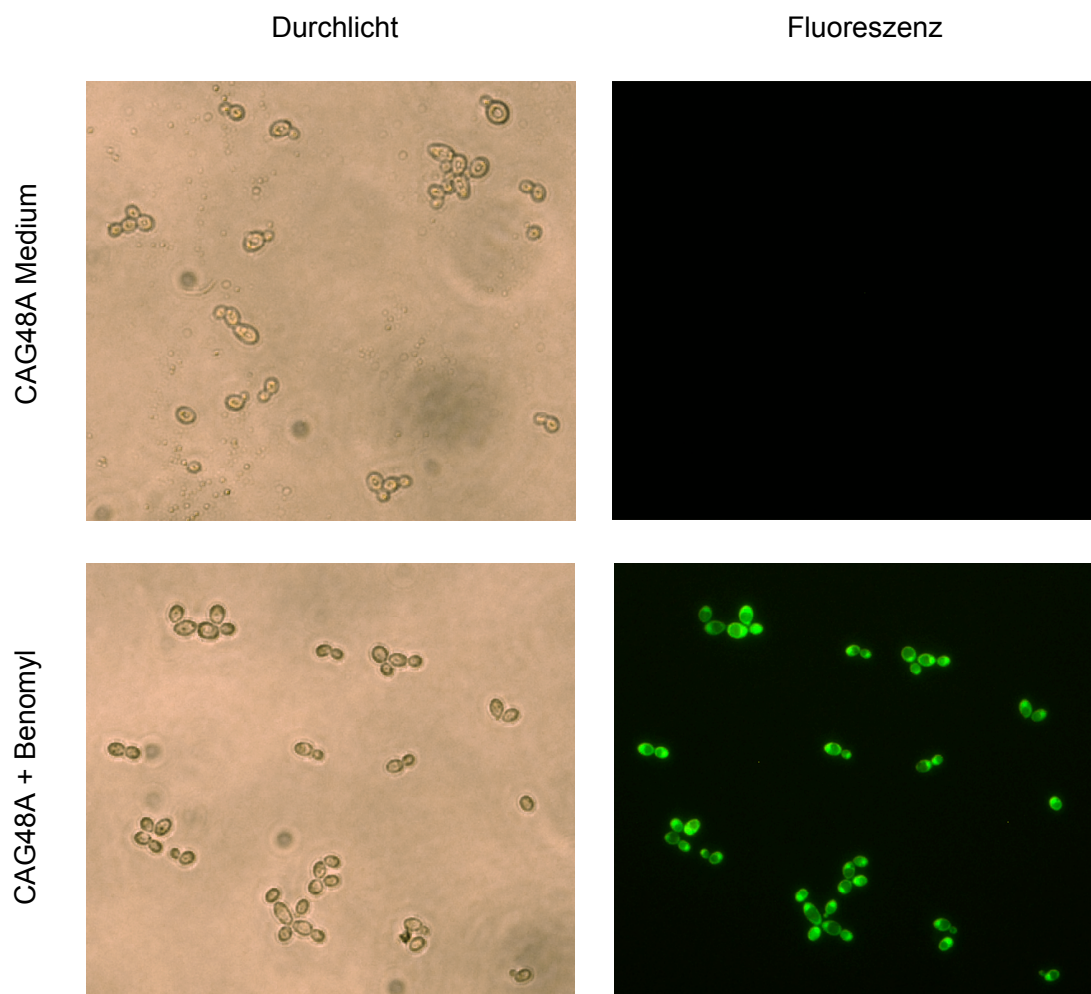
**Abbildung 1:** *MDR1*-Expressionsmessung durch RT-PCR. 1 :  $G_{sen}$ , 2 :  $G_{res}$ , 3 :  $G_{res}\Delta mdr1$ , 4 :  $H_2O$ , 5 : DNA

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.1.2. Fluoreszenz-Induktionsassay-Etablierung

Der Fluoreszenz-Induktionsassay basierte auf zwei GFP-Reporterstämmen (CAG48A/B), bei denen jeweils unter der Kontrolle des *MDR1*-Promotors auf einem Allel ein GFP-Gen das *MDR1*-Gen ersetzt. Bei Aktivierung des *MDR1*-Promotors zeigten beide Stämme durch Bildung von GFP grün fluoreszierende Zellen. Die Fluoreszenz war nach Induktion mit dem bekannten *MDR1*-Induktor Benomyl deutlich zu erkennen (Abbildung 2).

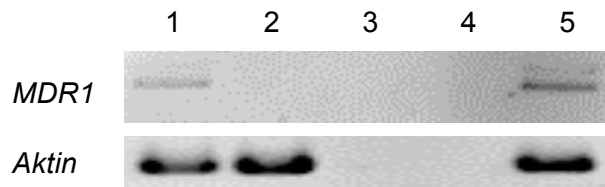


**Abbildung 2: Fluoreszenz-Induktionsassay.** CAG48A mit und ohne Induktion durch Benomyl 50 µg/mL, 24 h.

### 3. ERGEBNISSE

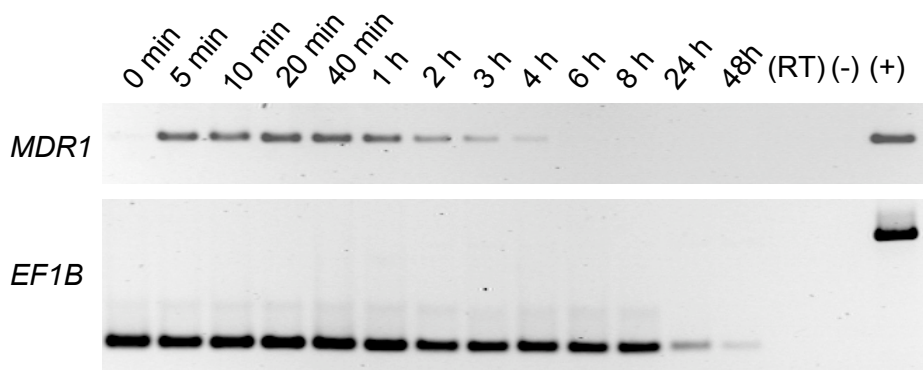
---

Die Produktion von *MDR1*-spezifischer RNA bei mikroskopischer Detektion von fluoreszierenden Zellen unter Benomyl-Induktion wurde durch RT-PCR beim Stamm CAG48A bestätigt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: *MDR1*-Expression beim Reporterstamm CAG48A.** 1 : CAG48A mit Benomyl (50 µg/mL, 2 h), 2 : CAG48A ohne Benomyl, 3: H<sub>2</sub>O (RT-PCR), 4 : H<sub>2</sub>O (PCR), 5: DNA; RT-PCR

Zur Bestimmung des geeigneten Messzeitpunktes für den Induktionsassay wurde zunächst eine *MDR1*-Kinetik für den Referenzstamm SC5314 unter Benomyl-Induktion erstellt (Abbildung 4). Es zeigte sich eine schnelle (5 min) Hochregulation von *MDR1*, die nach 1 h schwächer wurde und nach 4 h nicht mehr nachweisbar war.

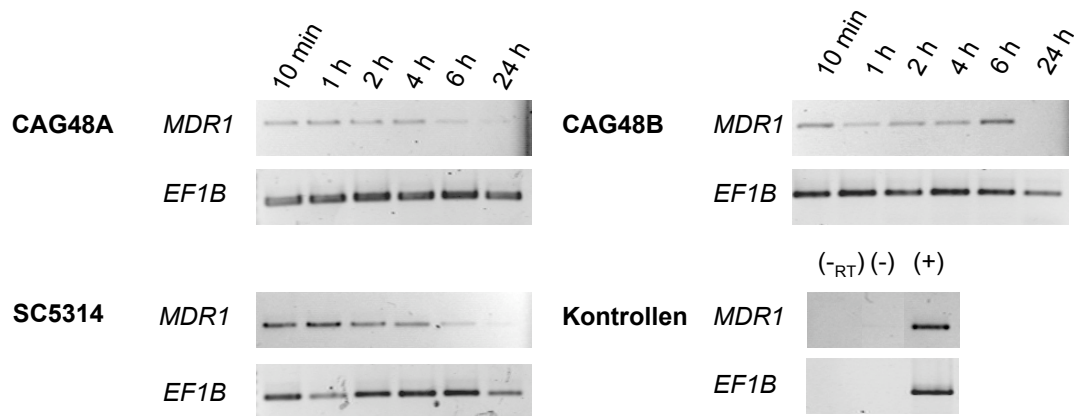


**Abbildung 4: *MDR1*-Expressionskinetik von SC5314 nach Benomyl-Induktion (50 µg/mL).** (RT): H<sub>2</sub>O (RT-PCR), (-) : H<sub>2</sub>O (PCR), (+) : DNA; RT-PCR

### 3. ERGEBNISSE

---

Im Vergleich zum Referenzstamm SC5314 wiesen beide Reporterstämme in der Expressionskinetik von *MDR1* nach Benomyl-Induktion keine Unterschiede auf. Bei allen Stämmen war eine schnelle Hochregulation (10 min) von *MDR1* nach Induktion nachweisbar (Abbildung 5).



**Abbildung 5: *MDR1*-Expression von CAG48A, CAG48B und SC5314 nach Benomyl-Induktion (50 µg/ml).** (-<sub>RT</sub>) : H<sub>2</sub>O (RT-PCR), (+) : DNA, (-) : H<sub>2</sub>O (PCR); RT-PCR

Die mikroskopisch beurteilbare Fluoreszenz wies im Gegensatz dazu eine etwas verlangsamte Kinetik auf. Nach 1 h zeigten sich zunächst wenige schwach fluoreszierende Zellen. Das Fluoreszenzmaximum wurde nach 2 - 4 h erreicht und blieb über 24 h unverändert.

#### 3.2. Fluoreszenz-Induktionsassay

Im Fluoreszenz-Induktionsassay wurde die Fluoreszenz des Reporterstammes CAG48A zu verschiedenen Messzeitpunkten im Vergleich zu einer Benomyl-Kontrolle (50 µg/mL) beurteilt. Insgesamt wurden 21 Substanzen und verschiedene Induktionsbedingungen geprüft. Zuvor war ein induzierender Einfluss der Lösungsmittel DMSO und Ethanol ausgeschlossen worden. Der Grad der Fluoreszenz einer Probe wurde mit der Fluoreszenz durch Benomyl-Induktion verglichen und als Relative Fluoreszenz ausgedrückt (Tabelle 14)

### 3. ERGEBNISSE

---

Tabelle 14: Auswertekriterien (Relative Fluoreszenz)

Fluoreszenz im Vergleich zur Benomyl-Kontrolle	Relative Fluoreszenz
Keine Fluoreszenz	0
Weniger fluoreszierende Zellen und/oder schwächere Fluoreszenz	1
Anzahl fluoreszierender Zellen und Fluoreszenzintensität äquivalent	2
Mehr fluoreszierende Zellen und/oder stärkere Fluoreszenz	3

#### 3.2.1. pH-Werte

Ingesamt zeigten sich bei pH-Werte zwischen pH 2 und pH 7 keine Fluoreszenzsignale. Lediglich bei pH Extremen im sauren (pH 1) und alkalischen (pH 9) Bereich waren wenige, schwach fluoreszente Zellen nachweisbar. Die Fluoreszenz fiel jedoch deutlich schwächer aus als die Benomyl-Kontrolle (Tabelle 15).

Tabelle 15: Relative Fluoreszenz bei verschiedenen pH-Werten.

Induktor	Messzeitpunkt			
	1h	2h	4h	24h
pH 1	0	0	0	1
pH 2	0	0	0	0
pH 3	0	0	0	0
pH 6	0	0	0	0
pH 7	0	0	0	0
pH 9	0	1	1	0

#### 3.2.2. Temperatur

Im Temperaturbereich von 4 °C bis 45 °C war keine Fluoreszenz-Induktion zu beobachten. Nur bei 54 °C zeigte sich eine relativ schwache und verzögerte Fluoreszenz (Tabelle 16).

### 3. ERGEBNISSE

---

**Tabelle 16: Relative Fluoreszenz bei verschiedenen Temperaturen**

Induktor	Messzeitpunkt			
	1h	2h	4h	24h
4 °C	0	0	0	0
27 °C	0	0	0	0
30 °C	0	0	0	0
37 °C	0	0	0	0
40 °C	0	0	0	0
45 °C	0	0	0	0
54 °C	0	1	1	2

#### 3.2.3. Salze und Cyclosporin A

Verschiedene Salze, die in der Genregulation von Mikroorganismen involviert sind, wurden in unterschiedlicher Konzentration getestet. Keine der Substanzen induzierte ein Fluoreszenzsignal (Tabelle 17). Der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A induzierte ebenfalls keine Fluoreszenz.

**Tabelle 17: Relative Fluoreszenz unter Einfluss von Salzen und Cyclosporin A.**

Induktor	Konzentration (mM)	Messzeitpunkt			
		1h	2h	4h	24h
CaCl <sub>2</sub>	0,3; 3; 30; 60	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
FeCl <sub>3</sub>	0,01; 0,1; 1	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
MgCl <sub>2</sub>	0,01; 0,1; 1	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
MnCl <sub>2</sub>	0,01; 0,1; 1	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0,01; 0,1; 1	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Cyclosporin A	0,1; 0,3; 3 (µg/mL)	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0



### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.2.4. Antimykotika

Die drei getesteten Antimykotika aus verschiedenen Substanzklassen (Polyene, Echinocandine, Triazole) induzierten keine Fluoreszenz (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Relative Fluoreszenz unter Antimykotika**

Induktor	Konzentration (µg/mL)	Messzeitpunkt			
		1h	2h	4h	24h
Amphotericin B	0,5; 1,5; 2,5; 5,6	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
Caspofungin	0,5; 1; 2	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Voriconazol	25; 50	0,0	0,0	0,0	0,0

#### 3.2.5. Antiparasitika

Von den fünf getesteten Antiparasitenmitteln zeigte lediglich Albendazol eine relativ späte und schwache Fluoreszenz-Induktion (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Relative Fluoreszenz unter Antiparasitika.**

Induktor	Konzentration (µg/mL)	Messzeitpunkt			
		1h	2h	4h	24h
Praziquantel	0,3; 0,6; 1,2; 3,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
Albendazol	2; 4	0,0	0,0	1,1	1,1
Thiabendazol	100; 500; 1000	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Spiramycin	5; 50	0,0	0,0	0,0	0,0
Sulfadiazin	50; 100	0,0	0,0	0,0	0,0

#### 3.2.6. Antibiotika

Bei den sieben getesteten Antibiotika unterschiedlicher Substanzklassen zeigte nur Rifampicin einen signifikanten Effekt. Bereits in niedrigen Konzentrationen von 5 µg/mL nach 1 h war eine schwache Fluoreszenz der Zellen erkennbar, die nach 4 h ein der Benomyl-Kontrolle vergleichbares Ausmaß annahm und bis 24 h stabil blieb. Hohe Rifampicin-Konzentrationen von 40 µg/mL führten

### 3. ERGEBNISSE

sogar bei deutlich mehr Zellen zu einem Fluoreszenzsignal als in der Benomyl-Kontrolle (Tabelle 20).

Tabelle 20: Relative Fluoreszenz unter Antibiotika

Induktor	Konzentration (µg/mL)	Messzeitpunkt			
		1h	2h	4h	24h
Penicillin	200; 300	0,0	0,0	0,0	0,0
Gentamicin	10; 15	0,0	0,0	0,0	0,0
Erythromycin	4; 8	0,0	0,0	0,0	0,0
Clindamycin	10; 20; 50	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Fusidinsäure	15; 30	0,0	0,0	0,0	1,1
Metronidazol	10; 50	0,0	0,0	0,0	0,0
Rifampicin	5; 10; 20; 40	1,1,1,1	2,2,2,3	2,2,2,3	2,2,2,3

#### 3.3. *MDR1*-RNA Expression nach Rifampicin-Induktion (RT-PCR)

Bei dem Reporterstamm CAG48A und dem Referenzstamm SC5314 wurden nach Rifampicin-Exposition (40 µg/mL, 4 h) die Expression von *MDR1*-spezifischer RNA durch RT-PCR analysiert (Abbildung 6). Beide Stämme zeigten unter Rifampicin eine *MDR1*-spezifische Bande.

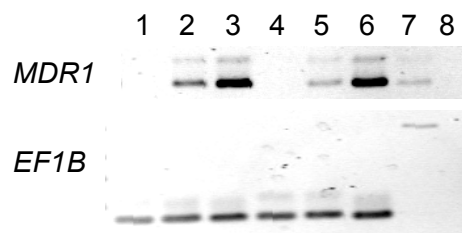


Abbildung 6: *MDR1*-RNA Expression nach Rifampicin-Induktion. 1 : SC5314 ohne Induktion, 2 : SC5314 mit Rifampicin (40 µg/mL, 4 h), 3 : SC5314 mit Benomyl (50 µg/mL, 4 h); 4 : CAG48A ohne, 5 : SC5314 mit Rifampicin (40 µg/mL, 4 h), 6 : SC5314 mit Benomyl (50 µg/mL, 4 h); 7 : DNA; 8 : H<sub>2</sub>O

#### 3.4. Quantitative Analyse der MDR1-RNA Expression (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Grad der Induktion quantifiziert. Es stellte sich heraus, dass durch 20 µg/mL Rifampicin eine vergleichsweise größere Anzahl von Zellen (32,8 %) eine Fluoreszenz-Induktion zeigten, als durch die Standard Benomyl-Konzentration (18,7 %) (Abbildung 7).

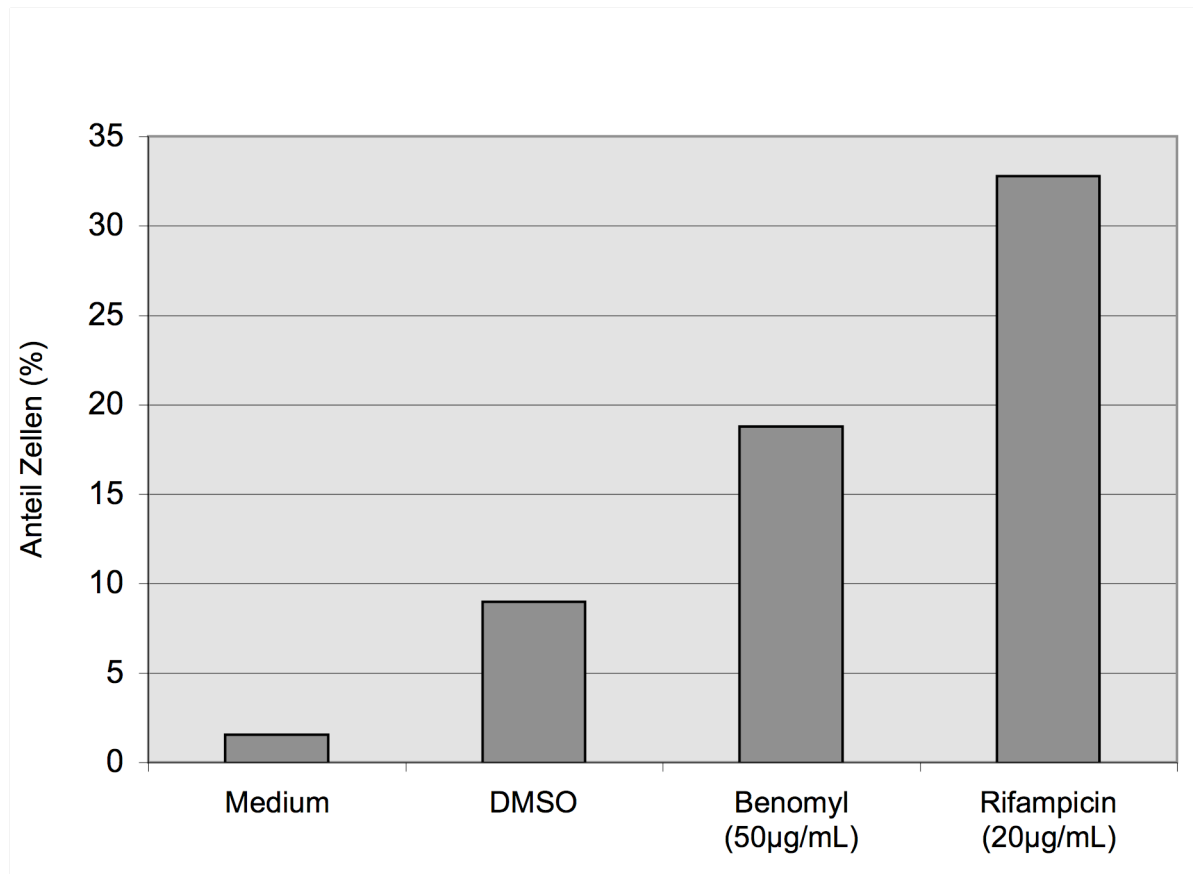
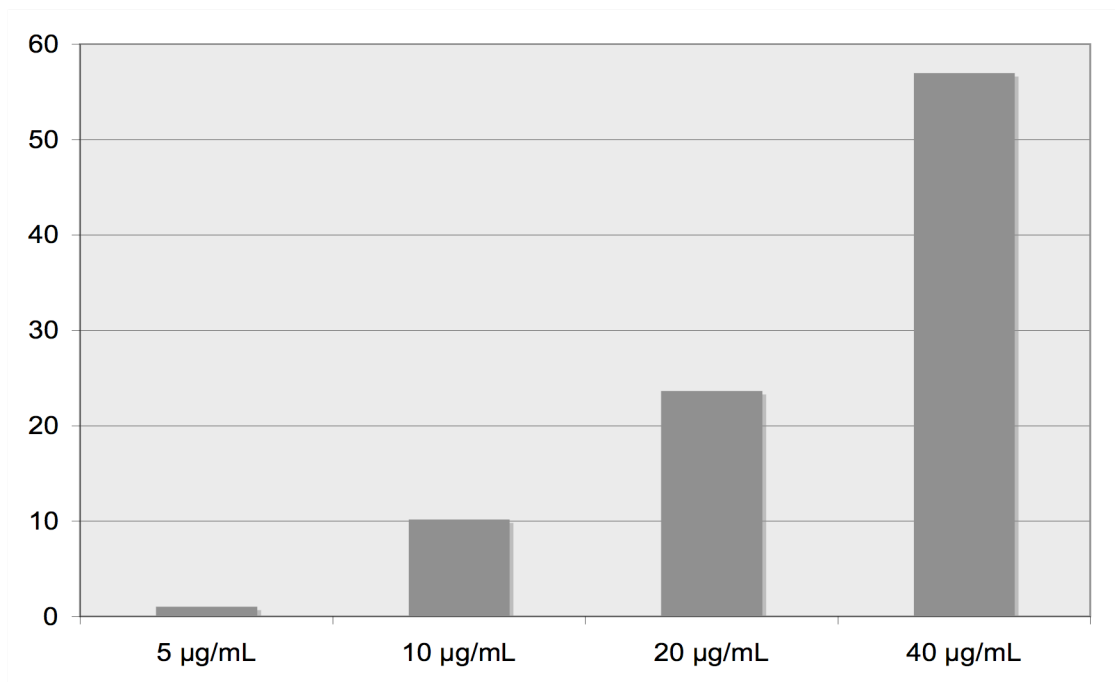


Abbildung 7: Prozentualer Anteil fluoreszierender Zellen (CAG48A) unter Rifampicin- und Benomyl-Exposition (FACS).

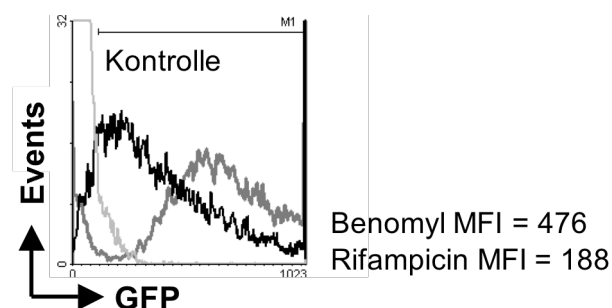
### 3. ERGEBNISSE

Die Fluoreszenzinduktion wies eine konzentrationsabhängige Steigerung auf. Schon bei 10 µg/mL zeigte sich bei etwa 10 % der Zellen ein Fluoreszenzsignal, dass unter Exposition mit 40 µg/mL Rifampicin bei mehr als 50 % der Zellen zu registrieren war (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Prozentualer Anteil fluoreszierender Zellen (CAG48A) bei unterschiedlichen Rifampicin-Konzentrationen.**

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) nach 2 h war jedoch bei Benomyl-stimulierten Zellen deutlich höher als bei den Rifampicin-stimulierten Zellen (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Mittlere Fluoreszenz von CAG48A.**

#### 3.5. MHK von Fluconazol in Kombination mit Rifampicin

Der Effekt der Rifampicin-Exposition auf die Sensitivität bzw. Resistenz gegen Fluconazol wurde am Referenzstamm SC5314 geprüft. In Gegenwart von Rifampicin-Konzentrationen zwischen 5 und 40 µg/mL wurde die MHK von Fluconazol bestimmt. In keiner der Versuchsreihen waren Unterschiede von mehr als einer Verdünnungsstufe zwischen Testungen ohne Rifampicin oder in Kombination mit unterschiedlichen Rifampicin-Konzentrationen zu beobachten (Tabelle 21). Alle Werte lagen im Bereich zwischen 0,25 und 1 µg/mL und damit im sensiblen Bewertungsbereich.

Tabelle 21: Fluconazol-MHK in Kombination mit Rifampicin

Rifampicin (µg/mL)	MHK Fluconazol (µg/mL)			
	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch
	1	2	3	4
0	≤ 0,25	≤ 0,25	0,5	0,5
5	0,25	≤ 0,25	0,5	0,5
10	≤ 0,25	≤ 0,25	0,5	1
20	≤ 0,25	≤ 0,25	0,5	1
40	≤ 0,25	≤ 0,25	0,5	0,5

### 4. Diskussion

Die Inzidenz invasiver Mykosen hat in den letzten Jahrzehnten insbesondere bei Patienten mit Defiziten der spezifischen und unspezifischen Abwehrfunktionen signifikant zugenommen. Der häufigste Erreger invasiver Mykosen ist *Candida albicans*. Fluconazol hat sich als verträglichere und weniger toxische Alternative zu Amphotericin B in der Therapie und Prophylaxe von Pilzinfektionen etabliert. Daher ist die parallel zu beobachtende Zunahme der Resistenzentwicklung von *Candida*-Stämmen gegen Fluconazol von großer klinischer Bedeutung. Im Gegensatz zu Bakterien spielen in der Resistenzentwicklung gegen Fluconazol bei *C. albicans* weniger übertragbare Resistenzmechanismen eine Rolle, sondern viel mehr die Induktion und Expression natürlicher, membrangebundener Effluxpumpen-Systeme wie *CDR1* und *MDR1*, deren physiologische Funktion wahrscheinlich in der Ausschleusung potentiell toxischer Substanzen aus der Zelle beruht. Verschiedene chemische Substanzen wie z.B. Benomyl und oxidativer Stress induzieren in *C. albicans* eine Expression von *MDR1*. Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung invasiver Mykosen sind häufig einer Vielzahl von chemotherapeutischen Medikamenten zur Therapie ihrer Grunderkrankung ausgesetzt. Es wäre denkbar, dass diese Substanzen bei den die Patienten besiedelnden *C. albicans* Stämmen auch zu einer Expression von Transportsystemen führen, die sekundär Fluconazol-Resistenz auslösen. Diese Arbeit verfolgte das Ziel, ein breites Spektrum an Substanzen, von denen ein Einfluss auf die Genexpression von *C. albicans* bekannt ist oder die klinisch bei Risikopatienten eingesetzt werden, auf ihr Potenzial zur Induktion von *MDR1* in *C. albicans* zu prüfen.

#### 4.1. Nachweis der *MDR1*-Induktion

Um ein breites Spektrum an Substanzen auf ihr Potenzial zur Induktion von *MDR1* zu testen, wurde ein fluorometrischer Induktionsassay entwickelt. Basis dieses Testes waren *Candida albicans* Reporterstämme (CAG48A, CAG48B), bei denen das Gen zur Produktion eines grünfluoreszierenden Proteins (GFP) unter die Kontrolle eines Allels des *MDR1*-Promoters gestellt worden war. Bei

Aktivierung des *MDR1*-Promoters wurde das Auftreten von grün fluoreszierenden *Candida* Zellen erwartet. Als Kontrolle für die Induktionsversuche wurde jeweils eine Stimulation mit Benomyl durchgeführt. Das durch Bindung an Tubulin fungistatisch wirkende Benomyl, das als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wird, ist ein spezifisches Substrat der Mdr1p-Effluxpumpe und bewirkt eine spezifische Hochregulation des *MDR1*-Gens [10, 34].

Zunächst wurde die Produktion von *MDR1*-spezifischer RNA bei Fluoreszenz der Reporterstämme durch RT-PCR bestätigt. Da die Produktion von GFP einem anderen zeitlichen Ablauf unterliegen konnte, als die Expression von *MDR1*-spezifischer RNA, wurde die Kinetik der RNA-Expression nach Benomyl-Stimulation und die Fluoreszenzentwicklung über 24 h geprüft. Es zeigte sich eine sehr schnelle Hochregulation von *MDR1* nach Stimulation innerhalb weniger Minuten, während die Entwicklung des Fluoreszenzsignals mit Beginn nach 1 h zeitlich verzögert auftrat und erst nach 2 - 4 h ihr Maximum erreichte. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die Produktion eines Proteins (GFP) erst nach entsprechender RNA-Expression abläuft. Die genetische Manipulation, die bei den Reporterstämmen jeweils ein *MDR1*-Gen deletiert und verändert hatte, führte jedoch nicht zu einer Änderung der *MDR1*-RNA-Produktion. Die *MDR1*-Expressionskinetik unterschied sich in beiden Reporterstämmen nicht von der des Referenzstammes. Damit war durch Einsatz der Reporterstämme ein gezieltes Screening nach Induktoren für *MDR1*-Expression möglich. Die mikroskopische Beurteilung wurde nach 1 h, 2 h und 4 h vorgenommen, um eine Benomyl-ähnliche Stimulation, die ihr Fluoreszenzmaximum in diesem Zeitraum zeigt, zu erfassen. Eine weitere Testung nach 24 h sollte verzögerte Induktionseffekte, die möglicherweise auf sekundären Prozessen beruhen konnten, aufzeigen. Die optische Bewertung der Fluoreszenzsignale erfolgte jeweils im Vergleich zu einer Benomyl-Stimulation, sodass Schwankungen zwischen den Testreihen ausgeglichen wurden. Sie wurde als „Relative Fluoreszenz“ mit Werten zwischen 0 und 3 angegeben. Eine relative Fluoreszenz von 2 entsprach dabei der Benomyl-Kontrolle.

### 4.2. Induktoren-Screening

#### 4.2.1. Einfluss von Determinanten der Genexpression von *C.albicans* auf die Expression von *MDR1*

*C. albicans* besiedelt im menschlichen Körper verschiedene Organsysteme wie z.B. den Darm und den weiblichen Genitaltrakt, in denen sehr unterschiedliche pH-Bedingungen herrschen. In Infektionsprozessen, die sich z.B. im Blut, Leber und anderen Geweben entwickeln, ist *C. albicans* weiteren pH-Änderungen ausgesetzt. Eine effektive Adaptation an den pH-Wert ist daher für das Überleben von *C. albicans* im humanen Organismus essentiell. Als Ausdruck bzw. Effekt dieser Adaptation sind verschiedene Funktionen und Genprogramme bei *C. albicans* durch den pH reguliert. So beeinflusst der pH die Morphologie: niedrige pH-Werten fördern das Hefewachstum, neutrale dagegen das Hyphenwachstum. Der Transkriptionsfaktor Rim101p reguliert die Gene *PHR1* und *PHR2*, die essentielle Zellwandproteine von *C. albicans* kodieren [24, 58, 86]. *PHR1* wird bei pH-Werten größer 5,5 exprimiert und in Zusammenhang gebracht mit Virulenz bei systemischen Infektionen. Das funktionell homologe *PHR2* wird dagegen bei niedrigeren pH-Werten (< 5,5) exprimiert und hat Bedeutung bei der *Candida*-Vaginose [91].

Da der pH-Wert in verschiedene Regulationsprozesse von *C. albicans* involviert ist, wurde ein Einfluss auf die Expression von *MDR1* geprüft. Im pH-Bereich zwischen 2 und 7 konnte kein Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Lediglich bei den pH-Extremen im sauren und alkalischen Bereich war eine schwache Fluoreszenz zu beobachten. Da sich im mittleren pH-Bereich keine Effekte aufzeigen ließen, die auf ein graduelles Ansprechen der *MDR1*-Expression auf pH-Änderung schliessen ließ, ist die Fluoreszenz in den Extrembereichen wahrscheinlich am ehesten als unspezifische Stressreaktion zu bewerten.

Verschiedene physiologische Eigenschaften und Virulenzmechanismen von *C. albicans* sind in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur reguliert [4, 46]. So wird z.B. das *CSH1*-Gen (englisch: **C**ell **s**urface **h**ydrophobicity) und dadurch die Zellhydrophobizität bei Temperaturen um 37 °C deutlich stärker exprimiert als bei 23° C [96]. Die virulenz-assoziierte Phospholipase B1 wird *in*



*vitro* ebenfalls stärker bei niedrigeren Temperaturen um 30 °C als bei 37 °C gebildet [72]. Von den Sezernierten Aspartyl Proteinasen (SAP), den bekanntesten Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans*, wird dagegen insbesondere SAP8 bevorzugt bei 25 °C exprimiert [69]. Der Einfluss von Temperatur auf die Expression von *MDR1* ist bislang dagegen noch unklar. Daher wurde ein breiter Temperaturbereich getestet. Es zeigte sich jedoch zwischen 4 °C und 45 °C kein sichtbarer Effekt auf die Expression von *MDR1*. Lediglich bei 54 °C war ein relativ schwaches und verzögertes Fluoreszenzsignal zu beobachten, das vermutlich als unspezifische Stressreaktion gedeutet werden kann.

Eine Vielzahl von Genen in *C. albicans* werden durch Calcium und Calcineurin reguliert. Dazu gehören auch Gene, die Ionenkanal-Aktivität steuern (*CCH1*), die Zellwandsynthese über die 1,3-beta-Glukan Synthese beeinflussen (*GSL21*) oder Reaktionen auf Stressoren kodieren (*IPF2839*, *MXR1*) [55]. Calcineurin ist eine bei eukaryonten Zellen konservierte Serin-Threonin-spezifische Proteinphosphatase. Diese Phosphatase besteht aus einer regulatorischen Einheit A und einer katalytischen Untereinheit B, die zusammen einen inaktiven heterodimeren Komplex bilden. Ein Anstieg des zytoplasmatischen Calciums in eukaryotischen Zellen führt zu einer Aktivierung von Calcineurin [82]. Durch Bindung von Calcium an Calcineurin kommt es zu einer Konformationsveränderung und damit zu einer Aktivierung des Enzyms [5, 47]. Calcineurin vermittelt *C. albicans* Toleranz gegen eine Vielzahl von inhibitorischen Substanzen einschließlich Antimykotika wie Azole. Es ist essentiell für das Überleben des Pilzes in serumhaltigen Medien oder in Gegenwart verschiedener externer Wachstumsinhibitoren [11, 81, 88]. Target von Calcineurin ist der Transkriptionsfaktor *CRZ1*, das einem Protein von *Saccharomyces cerevisiae* homolog ist [66]. Neben Calcium, sind Eisen, Zink, Magnesium und Mangan für eine Vielzahl an zellulären Prozessen in *C. albicans* essentiell z.B. als Bestandteil des katalytischen Zentrums von Enzymen [6, 7, 40, 51, 109]. Erhöhte Konzentrationen dieser Salze können jedoch auch toxische Wirkungen auf die Pilzzelle ausüben. Es wäre daher denkbar, dass auch die Expression von Effluxpumpen-Genen wie *MDR1* von einer definierten Konzentration dieser Substanzen abhängig ist. Verschiedene Salze und der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A wurden auf ihre Induktionsfä-

higkeit getestet. Es zeigte sich jedoch bei keiner der Testbedingungen ein Fluoreszenzsignal.

### 4.2.2. Einfluss von antimikrobiellen Substanzen auf die Expression von *MDR1*

Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine invasive Candidiasis erhalten häufig eine Vielzahl antimikrobieller Substanzen zur Prophylaxe oder Therapie verschiedener Infektionen. Insbesondere eine antimykotische Prophylaxe ist bei hämatologischen Patienten weit verbreitet. Effluxpumpen-Proteine vermitteln in erster Linie Resistenz gegen Antimykotika der Azol-Gruppe. Hierbei zeigen die ABC-Transporter (*CDR1*, *CDR2*) ein breiteres Substratprofil als der MFS-Transporter (*MDR1*), der von den Azolen selektiv Fluconazol transportiert [56]. Über Resistenzmechanismen gegen Polyene und Echinocandine ist bislang vergleichsweise wenig bekannt, beide Substanzgruppen stellen jedoch keine Substrate für *MDR1* in *C. albicans* dar [41, 77, 117]. Es wäre jedoch denkbar, dass Antimykotika in subinhibitorischen Konzentrationen auch einen gewissen Einfluss auf die Expression von nicht direkt involvierten Resistenzmechanismen nehmen könnten. Unter dieser Fragestellung wurden verschiedene Konzentrationen von Amphotericin B (Polyen), Caspofungin (Echinocandin) und Voriconazol (Azol) auf einen potentiellen Induktionseffekt auf *MDR1*-Expression getestet. Es waren jedoch keine Fluoreszenzsignale, die auf eine Aktivierung des *MDR1*-Promotors hinwiesen, zu beobachten.

Eine antiparasitische Therapie ist gelegentlich bei AIDS-Patienten indiziert, z.B. zur Behandlung einer Microsporidien-Infektion oder reaktivierten Toxoplasmose. Insbesondere bei dieser Patientengruppe werden am häufigsten Fluconazol-resistente *Candida*-Stämme isoliert. Die Arbeitsgruppe von Henry und Kollegen konnten nachweisen, dass das zur Microsporidien-Therapie eingesetzte Albendazol und das zur Toxoplasmose-Therapie indizierte Sulfadiazin in klinisch erreichbaren Konzentrationen eine signifikante Expression von *CDR1* in *C. albicans* auslösten und die Fluconazol-Wirkung *in vitro* antagonisierten [48]. Vor diesem Hintergrund wurden 5 verschiedene Antiparasitika unterschiedlicher Substanzklassen auf ihre Induktionsfähigkeit von *MDR1* getestet. So wurde

Praziquantel, Albendazol und Thiabendazol als Anthelmintika, sowie Sulfadiazin und Spiramycin als Toxoplasma-Mittel getestet. Im Kontrast zu der induzierenden Wirkung von Albendazol und Sulfadiazin auf *CDR1* zeigte keines der getesteten Antiparasitika einen Effekt auf die Expression von *MDR1*. Lediglich Albendazol wies einen relativ schwachen Induktionseffekt auf. Obwohl sowohl *CDR1* kodierte Effluxpumpen wie auch *MDR1* über einen aktiven Transport des Antimykotikums aus der Zelle zur Resistenz gegen Fluconazol beitragen, scheinen die Überschneidungen hinsichtlich anderer Substrate dieser Effluxpumpen sehr gering zu sein. Bislang ist auch noch ungeklärt, ob Albendazol und Sulfadiazin selbst als Substrate von *CDR1* fungieren oder nur einen indirekten induzierenden Einfluss besitzen. Da unterschiedliche Regulationsmechanismen in die Aktivierung von *CDR1* und *MDR1* involviert sind, ist ein derartig differenziertes Ansprechen auf verschiedene Stimuli nicht unerklärlich und belegt die große Adaptationsfähigkeit von *C. albicans*.

Am häufigsten werden Antibiotika zur Prophylaxe oder Therapie von Infektionen bei Risikopatienten eingesetzt. Man kann daher davon ausgehen, dass sich *C. albicans* Zellen „in situ“ an die Gegenwart von diversen Antibiotika anpassen müssen. Ausser den Beta-Laktam-Antibiotika, die einen hoch spezifischen bakteriellen Angriffspunkt in der Mureinsynthese besitzen, können Antibiotika aus anderen Substanzklassen über gemeinsame Zielstrukturen auch in geringem Maße antimykotische Effekte aufweisen. Insbesondere Sulfonamide, Makrolide und Gyrasehemmer verfügen über ein antimykotisches Potenzial [1]. So zeigt Sulfamethoxazol eine MHK von 50 µg/mL gegen *C. albicans* und wirkt mit Ketokonazol synergistisch [8]. Das Makrolid Azithromycin weist in Kombination mit Amphotericin B ebenfalls eine synergistische Wirkung gegen *Fusarium*-Arten auf und Trovafloxacin zeigt mit Amphotericin B eine additive Wirkung gegen *C. albicans* [16, 102]. Es ist daher gut vorstellbar, dass solche Antibiotika zwar alleine nicht ausreichende therapeutische „Antimykotika-Wirkung“ erreichen, aber dennoch von Pilzen als hinreichend toxisch erkannt werden und damit zur Induktion von Effluxpumpen-Systemen führen könnten.

In dieser Arbeit wurden neben einem Beta-Laktam (Penicillin G) als Kontrolle vor allem Antibiotika getestet, die über verschiedene Mechanismen als Inhibi-

toren der mikrobiellen Proteinsynthese wirken: Aminoglykoside (Gentamicin), Makrolide (Erythromycin), Lincosamide (Clindamycin) und Fusidinsäure. Daneben wurden mit Metronidazol und Rifampicin Inhibitoren der mikrobiellen Nukleinsäuresynthese geprüft.

Während alle Proteinsynthese-Inhibitoren und Metronidazol keinen Fluoreszenz-induzierenden Effekt aufwiesen, zeigte Rifampicin bereits in geringen Konzentrationen (5 µg/mL) ein deutliches und rasches Fluoreszenz-Signal. Bereits im Fluoreszenz-Induktionsassay war eine gewisse dosisabhängige Verstärkung des Signals zu beobachten. Zwischen 5 und 20 µg/mL Rifampicin zeigte sich ein der Benomyl-Kontrolle vergleichbares mikroskopisches Bild. Bei einer Konzentration von 40 µg/mL war dagegen die Fluoreszenz bei mehr Zellen ausgeprägt als in der Kontrolle. In der RT-PCR konnte die Expression von *MDR1*-spezifischer RNA nach Rifampicin-Induktion bestätigt werden. Dieses Phänomen zeigte nicht nur der Reporterstamm CAG48A sondern auch der Referenzstamm SC5314. Die quantitative Analyse im FACS zeigte einen deutlich höheren Anteil fluoreszierender Zellen nach Rifampicin-Exposition als in der Benomyl-Kontrolle, der ebenfalls eine dosisabhängige Zunahme erfuhr. Bei Rifampicin-Konzentrationen von 40 µg/mL zeigen 56% der Zellen ein Fluoreszenz-Signal.

### 4.3. Rifampicin

Das Antibiotikum Rifampicin ist ein halbsynthetisches Derivat von Rifamycin B. Rifamycine sind eine Gruppe strukturell ähnlicher, komplexer makrozyklischer Antibiotika, die aus dem Aktinomyzeten *Amycolatopsis mediterranei* (früher: *Streptomyces mediterranei*) isoliert werden [94].

Rifampicin hemmt die DNA-abhängigen RNA-Polymerase von Prokaryoten durch Bildung eines stabilen Arzneimittel-Enzym-Komplexes. Die  $\beta$ -Untereinheit des Enzyms ist der wesentliche Angriffspunkt von Rifamycinen. Dadurch wird die Initiation, nicht aber der Elongation der RNA-Synthese unterdrückt [14].

Rifampicin ist ein Antibiotikum mit einem breiten Wirkungsspektrum. Die antibiotische Wirkung betrifft hauptsächlich grampositive Bakterien und insbesondere Mykobakterien. Die Wirkung gegenüber gramnegative Bakterien ist demgegen-

über deutlich schwächer ausgeprägt [27]. Die geringere Sensitivität von gram-negativen Bakterien wird auf eine geringere Penetrationsfähigkeit des Antibiotikum durch die Zellwand/-membran zurückgeführt [111]. Rifampicin wird daher in erster Linie zur Therapie mykobakterieller Infektionen wie Tuberkulose und Lepra eingesetzt [22]. Ebenso dient es als Reserveantibiotikum bei Infektionen durch hoch resistente Staphylokokken wie z.B. MRSA. Wegen einer raschen Resistenzentwicklung unter Monotherapie wird Rifampicin nur in Kombination mit anderen Antibiotika und Antituberkulostatika, wie beispielsweise Isoniazid, eingesetzt [85, 104].

### 4.3.1. Rifampicin induziert *MDR1*-RNA

Obwohl bislang angenommen wird, dass die RNA-Polymerase von Eukaryonten wesentlich unempfindlicher gegen Rifampicin ist als die von Prokaryonten, konnten bereits mehrere Arbeiten synergistische Effekte von Rifampicin mit Amphotericin B auf verschiedene Spross- und Schimmelpilzarten nachweisen. Während Rifampicin allein MHKs von  $> 200 \mu\text{g/mL}$  gegen *Candida* aufweist, wirkt die Kombination von Rifampicin mit Amphotericin B synergistisch. Dabei zeigten *Candida*-Zellen mit steigender Rifampicin-Konzentration eine zunehmende Empfindlichkeit gegen Amphotericin B [9, 23, 68]. Auch bei anderen Spross- und Schimmelpilzarten, z. B. *Aspergillus* [16] und *Cryptococcus* [30] konnte dieser synergistische Effekt beobachtet werden. Es wird angenommen, dass durch die Amphotericin-vermittelten Schädigungen der Zellmembran eine verbesserte Rifampicin-Durchlässigkeit besteht und so erhöhte intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden, die für eine Inhibition der fungalen RNA-Polymerase ausreichen [23, 68]. Diese Hypothese wird unterstützt von Befunden, die einen synergistischen Effekt von Rifampicin mit Miconazol und Caspofungin zeigen, zwei Antimykotika, die durch andere Mechanismen eine Inhibition der Zellwandsynthese bewirken und so die Rifampicin-Aufnahme beeinflussen könnten [70, 101]. Eine Affinität der RNA-Polymerase II zu Rifampicin konnte bei *S. cerevisiae* bereits belegt werden [107].

Vor diesem Hintergrund ist erklärbar, dass Rifampicin zu einer Induktion von Effluxpumpensystemen wie *MDR1* als Entgiftungsmechanismus dieser poten-

tiell toxischen Substanz führen kann. Die dosisabhängige Induktionssteigerung weist hierbei auch auf einen direkten Rifampicin-gesteuerten Effekt hin. In menschlichen Zellen wirkt Rifampicin als potenter Induktor speziell von den zu den ABC-Transporten gehörenden P-Glykoproteinen und induziert daneben eine Reihe von Enzymen zur Metabolisierung von verschiedenen Medikamenten [75]. Ein ähnliches Induktionspotenzial auf Transportmechanismen bei *C. albicans* ist daher nicht unwahrscheinlich.

### 4.3.2. Rifampicin induziert keine Fluconazol-Resistenz

Die Expression von Mdr1p ist als Resistenzmechanismus von *C. albicans* gegen Fluconazol belegt [13]. Obwohl durch Rifampicin eine Expression von *MDR1*-spezifischer RNA gezeigt werden konnte, war in Resistenztestungen keine Resistenz der exponierten Stämme gegen Fluconazol messbar.

Erhöhte mRNA Level führen nicht immer zu einer vermehrten Expression des entsprechenden Proteins. Eine erhöhte mRNA-Expression kann z.B. in verändertem Transport aus dem Zellkern, in Änderungen der Translationseffizienz oder in einem beschleunigten RNA-Abbau begründet sein [113]. In diesem Fall würde die durch Rifampicin ausgelöste Expression von *MDR1*-spezifischer RNA nicht zur Produktion von Mdr1p führen. Es wird Aufgabe folgender Arbeiten sein, Mdr1p in Rifampicin stimulierten *C. albicans* Zellen z.B. durch spezifische Antikörper nachzuweisen.

Eine zweite Erklärung könnte darin liegen, dass Rifampicin möglicherweise ein effektiveres Substrat für Mdr1p darstellt als Fluconazol. Dann würde nach Hochregulierung der Effluxpumpensysteme eine Konkurrenz von Rifampicin und Fluconazol stattfinden, und bei stärkerer Affinität von Rifampicin zu den Effluxsystemen die intrazelluläre Fluconazol-Konzentration nicht gesenkt werden. In nachfolgenden Arbeiten müsste untersucht werden, ob und ggf. mit welcher Effizienz Rifampicin ein Substrat von Mdr1p darstellt.

### 4.4. Ausblick

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Frage war, ob Medikamente, die Risikopatienten für eine invasive Candidiasis erhalten, eine Fluconazol-Resistenz bei besiedelnden *Candida albicans* Stämmen auslösen können. Es konnte gezeigt werden, dass Rifampicin einen effektiven Induktor für die Expression von *MDR1* spezifischer RNA darstellt. Bei therapeutischer Anwendung im Menschen werden Rifampicin-Serumspiegel bis etwa 10 µg/mL erreicht. Eine *in vitro* Induktion von *MDR1* konnte bereits bei diesen Konzentrationen beobachtet werden. Die Wirkstoffkonzentration auf Schleimhäuten ist bislang nicht klar, jedoch können deutlich höhere Gewebespiegel erreicht werden. Eine *in vivo* Induktion von *MDR1* bei besiedelnden Stämmen kann somit nicht ausgeschlossen werden und sollte in klinischen Isolaten z.B. von Patienten unter antituberkulostatischer Therapie geprüft werden. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde postuliert, dass Rifamycine konservierte Signalmoleküle darstellen, die bei einer Vielzahl von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen und Viren aktiv auf die Regulation verschiedener Signalwege eingreifen [27]. Es wäre daher ein interessanter Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte, die Wirkung von Rifampicin auf die Genexpression bei *C. albicans* und anderen humanpathogenen Pilzen über Resistenzgene hinaus zu untersuchen.

### 5. Zusammenfassung

Im Gegensatz zu den übertragbaren Resistenzmechanismen von Bakterien spielen in der Resistenzentwicklung gegen Fluconazol bei *Candida albicans* die Expression natürlicher Transport-Systeme wie *MDR1* eine dominierende Rolle. Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung invasiver Mykosen erhalten in der Regel aufgrund ihrer Grunderkrankungen eine Vielzahl von chemotherapeutischen Medikamenten (Antibiotika, Antiparasitika, Zytostatika u.a.). Es wäre denkbar, dass durch therapeutischen Einsatz dieser Substanzen bei mit *C.albicans* besiedelten Patienten eine Expression von Transport-systemen induziert wird, die sekundär Fluconazol-Resistenz auslösen. Es war Ziel dieser Arbeit, ein breites Spektrum an Substanzen, die klinisch bei Risikopatienten eingesetzt werden, auf ihr Potenzial zur Induktion von *MDR1* in *C. albicans* zu prüfen.

Für die Austestung der Reagenzienpalette (3 Antimykotika, 5 Antiparasitika, 7 Antibiotika) wurde ein Fluoreszenz-Induktionsassay etabliert, der auf zwei *C. albicans* Reporterstämmen basierte, bei denen jeweils auf einem Allel unter die Kontrolle des *MDR1* Promotors ein GFP-Gen (grün fluoreszierendes Protein) gesetzt worden war.

Von allen Testsubstanzen zeigte nur Rifampicin einen Induktionseffekt. Die *MDR1*-Induktion wurde durch RT-PCR bestätigt und mittels FACS-Analyse quantifiziert. Im Vergleich zu dem bekannten *MDR1*-Induktor Benomyl wies Rifampicin bereits in niedrigen Konzentrationen von 5-10 µg/mL einen induzierenden Effekt auf. Diese Expression von *MDR1*-spezifischer RNA war bereits nach wenigen Minuten nachweisbar und zeigte eine deutliche dosisabhängige Steigerung. Trotz Expression von *MDR1*-spezifischer RNA konnten in einer Kombinationstestung von Fluconazol und Rifampicin bis 40 µg/mL keine erhöhten MHK-Werte für *C.albicans* gezeigt werden.

Obwohl *in vitro* keine resistenzauslösende Wirkung belegt werden konnte, zeigte sich doch ein deutlicher Effekt eines Antibiotikums auf die Genexpression des Sprosspilzes *C. albicans*. Ob dieses Phänomen *in vivo* von Bedeutung ist, muss in zukünftigen Arbeiten geprüft werden. Es wäre dabei auch ein interessanter Aspekt, die Wirkung von Rifampicin auf die Genexpression bei *C. albi-*



*cans* und anderen humanpathogenen Pilzen über Resistenzgene hinaus zu untersuchen. Letzendlich ist nicht auszuschließen, dass sich mit der Entwicklung neuer Medikamente z.B. für die Behandlung von Infektionen immunsuppremierter Patienten auch neue Forschungsansätze in der Mykologie ergeben.

### 6. Abkürzungsverzeichnis

#### 6.1. Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
RMP	rotations per minute (Umdrehung pro Minute)
U	Units (Einheiten)
V	Volt

#### 6.2. Weitere Abkürzungen

A	Adenin
ABC-Transporter	ATP Binding Cassette-Transport
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATP	Adenosin Triphosphat
ACT	Actin
BEN <sup>r</sup>	Benomyl-Resistenz
C	Cytosin
C.	Candida
CDR	Candida Drug Resistance
cDNA	copy DNA
Cne	Candida neoformans
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HGA	Hefe-Gentamicin-Agar
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
EF1B	Elongationfactor 1B
Rv	reverse
fd	forward
et al.	und andere
FLU	Fluconazol resistance

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Green Fluorescence Protein
HIV	Human Immuno-deficiency Virus
Mdr1p	Protein von MDR1
MDR	Multi Drug Resistance
MFS	Major Facilitator Superfamily
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHK	Minimale Hemmkonzentration
OD	Optical Density (optische Dichte)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Wasserstoffionen-Konzentration
RNA	Ribonucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
spp.	Abkürzung für die Mehrzahl von Species = die Arten
T	Thymin
TAC1	Transcriptional Activator of CDR
Taq	Thermus aquaticus
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett

7. Anhang

**Tabelle 22: Geräteliste.**

Agarose-Elektrophoresekammern Autoklav	Mini-Sub Cell GT, Sub-Cell GTI 5075 EL	Bio-Rad, München Tuttnauer-Systec, Wettenberg
Brutschrank	FunctionLine Serie Serie 7000 B20	Kendro-Heaeus, Hanau
Durchflusszytometer Geldokumentation	FACSCalibur Gel Doc 1000 BioDocAnalyze	BD Biosciences, Heidelberg Bio-Rad, München Whatman Biometra, Göttingen
Kühlschrank	Super 720	Kirsch, Offenburg
Magnetheizrührer	Ikamag RCT basic	IKA Werk, Staufen
Mikroskope	Axiolab, Axiovert 25 Leica DM RE	Carl Zeiss, Jena Leica, Bensheim
PCR-Heizblock	T3 Thermocycler TGradient	Whatman Biometra, Göttingen Whatman Biometra, Göttingen
ph-Meter	pH 535 MultiCal inoLab pH level 2	WTW, Weilheim WTW, Weilheim
Pipetten	Reference, Research	Eppendorf, Hamburg
Schüttelheizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	Multitron II, AK 82	Infors, Bottmingen, CH
Schüttel- und Mischgeräte	Reax top, Unimax 2010 neoLab Rotator Taumel-RM5	Heidolph, Schwabach neoLab Migge, Heidelberg Hecht, Sondheim
Sicherheitswerkbank Spannungsquelle für Elektrophorese	BDK-S 1800 PowerPac	BDK, Sonnenbühl-Genkingen Bio-Rad, München
Waage	BP 610,I801	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	WB10	Memmert, Schwabach
Wasseraufbereitung	Milli-Q Synthesis Q-Grad 3	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Centrifuge 5417-R MiniSpin plus Multifuge3S-R Biofuge stratos Megafuge1.0 Sorvall RC-5C plus	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Kendro-Heraeus, Hanau Kendro-Heraeus, Hanau Kendro-Heraeus, Hanau Kendro-Heraeus, Hanau

**Tabelle 23: Liste der Verbrauchsmaterialien.**

Eindeckmedium für Immunfluoreszenz (Fluoprep)	BioMérieuy, Marcy, F
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
Einmalküvetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Glasgefäße und -flaschen	Schott, Mainz Fisher-Scientific, Schwerte
Impfeschlingen	Sarstedt, Nürmbrecht
PCR-Gefäße	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Greiner bio-one, Nürtingen

## 7. ANHANG

---

Pipettenspitzen	Brand, Wertheim Sarstedt, Nürmbrecht Greiner bio-one, Nürtingen
Objektträger	Langenbrinck, Teningen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen	50 mL: Becton Dickinson, Heidelberg 15 mL: Greiner bio-one, Nürtingen
Universalindikator-Papier	Macherey-Nagel, Düren

8. Literaturverzeichnis

- [1] Afeltra, J. and Verweij, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; **22**:397-407.
- [2] Alarco, A. M. and Raymond, M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1999; **181**:700-708.
- [3] Albertson, G. D., Niimi, M., Cannon, R. D. and Jenkinson, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**:2835-2841.
- [4] Antley, P. P. and Hazen, K. C. Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. *Infect Immun* 1988; **56**:2884-2890.
- [5] Aramburu, J., Rao, A. and Klee, C. B. Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 2000; **36**:237-295.
- [6] Bedell, G. W. and Anderson, R. V. Inhibition of the differentiation of *Candida albicans* by the chelator 1,10-phenanthroline. *Mycopathologia* 1985; **92**:161-167.
- [7] Bedell, G. W. and Soll, D. R. Effects of low concentrations of zinc on the growth and dimorphism of *Candida albicans*: evidence for zinc-resistant and -sensitive pathways for mycelium formation. *Infect Immun* 1979; **26**:348-354.
- [8] Beggs, W. H. Combined activity of ketoconazole and sulphamethoxazole against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 1982; **10**:539-541.
- [9] Beggs, W. H., Sarosi, G. A. and Walker, M. I. Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Candida* species. *J Infect Dis* 1976; **133**:206-209.
- [10] Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G. A., Becker, J. M. and Koltin, Y. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**:648-652.
- [11] Blankenship, J. R., Wormley, F. L., Boyce, M. K., Schell, W. A., Filler, S. G., Perfect, J. R. and Heitman, J. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot Cell* 2003; **2**:422-430.
- [12] Bustamante, C. I. Treatment of *Candida* infection: a view from the trenches! *Curr Opin Infect Dis* 2005; **18**:490-495.
- [13] Calabrese, D., Bille, J. and Sanglard, D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 2000; **146** ( Pt 11):2743-2754.

- [14] Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. and Darst, S. A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 2001; **104**:901-912.
- [15] Capek, A., Simek, A., Bruna, L., Svab, A. and Budesinsky, Z. Antimicrobial agents. XX. Ergosterol content of *Candida albicans* cells during adaptation to antimycotics. *Folia Microbiol (Praha)* 1974; **19**:79-80.
- [16] Clancy, C. J., Yu, Y. C., Lewin, A. and Nguyen, M. H. Inhibition of RNA synthesis as a therapeutic strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*: demonstration of in vitro synergy between rifabutin and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:509-513.
- [17] Cohen, R., Roth, F. J., Delgado, E., Ahearn, D. G. and Kalser, M. H. *Fungal flora of the normal human small and large intestine*, 1969.
- [18] Coste, A. T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J. and Sanglard, D. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* 2004; **3**:1639-1652.
- [19] Cutler, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; **45**:187-218.
- [20] de Repentigny, L., Aumont, F., Bernard, K. and Belhumeur, P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 2000; **68**:3172-3179.
- [21] Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. and De Waard, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol* 2000; **30**:1-15.
- [22] Douglas, J. G. and McLeod, M. J. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacokinet* 1999; **37**:127-146.
- [23] Edwards, J. E., Jr., Morrison, J., Henderson, D. K. and Montgomerie, J. Z. Combined effect of amphotericin B and rifampin on *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **17**:484-487.
- [24] El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W. A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M. and Muhlschlegel, F. A. Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 2000; **20**:4635-4647.
- [25] Filler, S. G., Ibe, B. O., LUCKETT, P. M., Raj, J. U. and Edwards, J. E., Jr. *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. *J Infect Dis* 1991; **164**:928-935.

- [26] Fling, M. E., Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J. A., Smith, H. A. and Koltin, Y. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen Genet* 1991; **227**:318-329.
- [27] Floss, H. G. and Yu, T. W. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev* 2005; **105**:621-632.
- [28] Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 1993; **134**:717-728.
- [29] Franz, R., Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Ruhnke, M. and Morschhauser, J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:3065-3072.
- [30] Fujita, N. K. and Edwards, J. E., Jr. Combined in vitro effect of amphotericin B and rifampin on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **19**:196-198.
- [31] Gillum, A. M., Tsay, E. Y. and Kirsch, D. R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 1984; **198**:179-182.
- [32] Glee, P. M., Cutler, J. E., Benson, E. E., Bargatze, R. F. and Hazen, K. C. Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow. *Infect Immun* 2001; **69**:2815-2820.
- [33] Glee, P. M., Sundstrom, P. and Hazen, K. C. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infect Immun* 1995; **63**:1373-1379.
- [34] Goldway, M., Teff, D., Schmidt, R., Oppenheim, A. B. and Koltin, Y. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BENr* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:422-426.
- [35] Gottesman, M. M. and Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**:385-427.
- [36] Grünenthal Fachinformation Penicillin "Grünenthal". 2002.
- [37] Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M. and Diekema, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; **37**:1172-1177.
- [38] Gupta, V., Kohli, A., Krishnamurthy, S., Puri, N., Aalamgeer, S. A., Panwar, S. and Prasad, R. Identification of polymorphic mutant alleles of *CaMDR1*, a major facilitator of *Candida albicans* which confers multidrug resistance, and its in vitro transcriptional activation. *Curr Genet* 1998; **34**:192-199.



- [39] Gustafson, K. S., Vercellotti, G. M., Bendel, C. M. and Hostetter, M. K. Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest* 1991; **87**:1896-1902.
- [40] Haas, H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; **62**:316-330.
- [41] Hamilton-Miller, J. M. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. *Adv Appl Microbiol* 1974; **17**:109-134.
- [42] Harry, J. B., Oliver, B. G., Song, J. L., Silver, P. M., Little, J. T., Choiniere, J. and White, T. C. Drug-induced regulation of the MDR1 promoter in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:2785-2792.
- [43] Hazen, B. W. and Hazen, K. C. Modification and application of a simple, surface hydrophobicity detection method to immune cells. *J Immunol Methods* 1988; **107**:157-163.
- [44] Hazen, K. C. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun* 1989; **57**:1894-1900.
- [45] Hazen, K. C. and Glee, P. M. Cell surface hydrophobicity and medically important fungi. *Curr Top Med Mycol* 1995; **6**:1-31.
- [46] Hazen, K. C. and Hazen, B. W. Temperature-modulated physiological characteristics of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 1987; **31**:497-508.
- [47] Hemenway, C. S. and Heitman, J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys* 1999; **30**:115-151.
- [48] Henry, K. W., Cruz, M. C., Katiyar, S. K. and Edlind, T. D. Antagonism of azole activity against *Candida albicans* following induction of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**:1968-1974.
- [49] Higgins, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* 2001; **152**:205-210.
- [50] Hoyer, L. L., Clevenger, J., Hecht, J. E., Ehrhart, E. J. and Poulet, F. M. Detection of Als proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues. *Infect Immun* 1999; **67**:4251-4255.
- [51] Hu, C. J., Bai, C., Zheng, X. D., Wang, Y. M. and Wang, Y. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J Biol Chem* 2002; **277**:30598-30605.

- [52] Jung, H., Hurtado, M., Sanchez, M., Medina, M. T. and Sotelo, J. Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol* 1990; **13**:559-564.
- [53] Jung, H., Medina, R., Castro, N., Corona, T. and Sotelo, J. Pharmacokinetic study of praziquantel administered alone and in combination with cimetidine in a single-day therapeutic regimen. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:1256-1259.
- [54] Kaale, E., Long, Y., Fonge, H. A., Govaerts, C., Desmet, K., Van Schepdael, A. and Hoogmartens, J. Gentamicin assay in human serum by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; **26**:640-647.
- [55] Karababa, M., Valentino, E., Pardini, G., Coste, A. T., Bille, J. and Sanglard, D. CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 2006; **59**:1429-1451.
- [56] Kohli, A., Gupta, V., Krishnamurthy, S., Hasnain, S. E. and Prasad, R. Specificity of drug transport mediated by CaMDR1: a major facilitator of *Candida albicans*. *J Biosci* 2001; **26**:333-339.
- [57] Letscher-Bru, V. and Herbrecht, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**:513-521.
- [58] Lotz, H., Sohn, K., Brunner, H., Muhlschlegel, F. A. and Rupp, S. RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. *Eukaryot Cell* 2004; **3**:776-784.
- [59] Louie, A., Deziel, M., Liu, W., Drusano, M. F., Gumbo, T. and Drusano, G. L. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:5058-5068.
- [60] Maneu, V., Cervera, A. M., Martinez, J. P. and Gozalbo, D. Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (EFB1) coding for the elongation factor EF-1 beta. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **145**:157-162.
- [61] Maneu, V. C., AM; Martinez, JP; Gozalbo, D. Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (EFB1) coding for the elongation factor EF-1b. *FEMS Microbiology Letter*, 145: 157-162. 1996.
- [62] Mannisto, P., Tuomisto, J. and Rasanen, R. Absorption of erythromycin. A cross-over study in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 1975; **25**:1828-1831.
- [63] Marcantonio, E. E. and Hynes, R. O. Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin beta 1 subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates, and fungi. *J Cell Biol* 1988; **106**:1765-1772.

- [64] Marr, K. A., Lyons, C. N., Rustad, T. R., Bowden, R. A. and White, T. C. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:2584-2589.
- [65] Masuoka, J., Wu, G., Glee, P. M. and Hazen, K. C. Inhibition of *Candida albicans* attachment to extracellular matrix by antibodies which recognize hydrophobic cell wall proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; **24**:421-429.
- [66] Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S. and Cunningham, K. W. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1997; **11**:3445-3458.
- [67] Mather, L. E., Austin, K. L., Philpot, C. R. and McDonald, P. J. Absorption and bioavailability of oral erythromycin. *Br J Clin Pharmacol* 1981; **12**:131-140.
- [68] Medoff, G., Kobayashi, G. S., Kwan, C. N., Schlessinger, D. and Venkov, P. Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B (yeast-membrane permeability-ribosomal RNA-eukaryotic cell-synergism). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; **69**:196-199.
- [69] Monod, M., Hube, B., Hess, D. and Sanglard, D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 1998; **144 ( Pt 10)**:2731-2737.
- [70] Moody, M. R., Young, V. M., Morris, M. J. and Schimpff, S. C. In vitro activities of miconazole, miconazole nitrate, and ketoconazole alone and combined with rifampin against *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata* recovered from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **17**:871-875.
- [71] Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Colombo, A. L., Thompson-Moya, L., Smietana, J., Lupinacci, R., Sable, C., Kartsonis, N. and Perfect, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2002; **347**:2020-2029.
- [72] Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. and Ghannoum, M. A. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology* 2003; **149**:261-267.
- [73] NERY-SILVA, F. A., MACHADO, J. D. C., DE OLIVEIRA LIMA, L. Z. C. and VILELA DE RESENDE, M. R. L. C. CHEMICAL CONTROL OF STEM-END ROT OF PAPAYA FRUIT CAUSED BY *Colletotrichum gloeosporioides*. *Editores UFLA* 2001.

- [74] Nielsen, P. and Gyrd-Hansen, N. Bioavailability of spiramycin and lincosamin after oral administration to fed and fasted pigs. *J Vet Pharmacol Ther* 1998; **21**:251-256.
- [75] Niemi, M., Backman, J. T., Fromm, M. F., Neuvonen, P. J. and Kivisto, K. T. Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**:819-850.
- [76] Niewerth, M., Kunze, D., Seibold, M., Schaller, M., Korting, H. C. and Hube, B. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:1805-1817.
- [77] Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A. R., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B. C. and Cannon, R. D. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**:1148-1155.
- [78] Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. and Wingard, J. R. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:196-199.
- [79] Novartis Fachinformation zu Neoral. 2003.
- [80] Odds, F. C. *Candida and candidosis*. 2nd ed. London, England: Balliere Tindall. 1988.
- [81] Onyewu, C., Wormley, F. L., Jr., Perfect, J. R. and Heitman, J. The calcineurin target, Crz1, functions in azole tolerance but is not required for virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 2004; **72**:7330-7333.
- [82] Perrino, B. A., Ng, L. Y. and Soderling, T. R. Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain. *J Biol Chem* 1995; **270**:7012.
- [83] Pfizer Fachinformation zu VFEND®. 2006.
- [84] Pharmacia-Upjohn Fachinformation zu Clindamycin. 1996.
- [85] Potter, B., Rindfleisch, K. and Kraus, C. K. Management of active tuberculosis. *Am Fam Physician* 2005; **72**:2225-2232.
- [86] Ramon, A. M., Porta, A. and Fonzi, W. A. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J Bacteriol* 1999; **181**:7524-7530.
- [87] Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P. A. and Bille, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is

involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**:2753-2765.

[88] Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J. and Bille, J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 2003; **48**:959-976.

[89] Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**:2300-2305.

[90] Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M. and Bille, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:2378-2386.

[91] Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. and Fonzi, W. A. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1995; **15**:601-613.

[92] Schaller, M., Schafer, W., Korting, H. C. and Hube, B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 1998; **29**:605-615.

[93] Schoonbeek, H. J., Raaijmakers, J. M. and De Waard, M. A. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Mol Plant Microbe Interact* 2002; **15**:1165-1172.

[94] Sensi, P., Greco, A. M. and Ballotta, R. Rifomycin. I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. *Antibiot Annu* 1959; **7**:262-270.

[95] Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. and Sibley, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**:40-79.

[96] Singleton, D. R. and Hazen, K. C. Differential surface localization and temperature-dependent expression of the *Candida albicans* CSH1 protein. *Microbiology* 2004; **150**:285-292.

[97] Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L. and Sundstrom, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 1999; **283**:1535-1538.

[98] Staab, J. F. and Sundstrom, P. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. *Yeast* 1998; **14**:681-686.

[99] Stathopoulos, A. M. and Cyert, M. S. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 1997; **11**:3432-3444.

- [100] Stille Antibiotika-Therapie, Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung. *Schattauer* 2005; **11. Auflage**.
- [101] Stone, J. A., Migoya, E. M., Hickey, L., Winchell, G. A., Deutsch, P. J., Ghosh, K., Freeman, A., Bi, S., Desai, R., Dilzer, S. C., Lasseter, K. C., Kraft, W. K., Greenberg, H. and Waldman, S. A. Potential for interactions between caspofungin and nelfinavir or rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:4306-4314.
- [102] Sugar, A. M. Making antifungal susceptibility testing a clinically useful tool. *Clin Infect Dis* 1997; **24**:248-249.
- [103] Tiraboschi, I. N., Bennett, J. E., Kauffman, C. A., Rex, J. H., Girmenia, C., Sobel, J. D. and Menichetti, F. Deep Candida infections in the neutropenic and non-neutropenic host: an ISHAM symposium. *Med Mycol* 2000; **38 Suppl 1**:199-204.
- [104] Turnidge, J. and Grayson, M. L. Optimum treatment of staphylococcal infections. *Drugs* 1993; **45**:353-366.
- [105] Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., Bellens, D., Moereels, H. and Janssen, P. A. Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 alpha-demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem Soc Trans* 1990; **18**:56-59.
- [106] Vardy, L. and Toda, T. The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *Embo J* 2000; **19**:6098-6111.
- [107] Venkov, P. V., Milchev, G. I. and Hadjiolov, A. A. Rifampin susceptibility of ribonucleic acid synthesis in a fragile *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; **8**:627-632.
- [108] Villanueva, A., Arathoon, E. G., Gotuzzo, E., Berman, R. S., DiNubile, M. J. and Sable, C. A. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. *Clin Infect Dis* 2001; **33**:1529-1535.
- [109] Walker, G. M., Sullivan, P. A. and Shepherd, M. G. Magnesium and the regulation of germ-tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1984; **130**:1941-1945.
- [110] Wegmann, T. [The antimycotic drugs]. *Internist (Berl)* 1989; **30**:46-50.
- [111] Wehrli, W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis* 1983; **5 Suppl 3**:S407-411.
- [112] Wenzel, R. P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995; **20**:1531-1534.

- [113] White, T. C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:1482-1487.
- [114] Wirsching, S., Michel, S., Kohler, G. and Morschhauser, J. Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol* 2000; **182**:400-404.
- [115] Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. and Edmond, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; **39**:309-317.
- [116] Wolfger, H., Mamnun, Y. M. and Kuchler, K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* 2001; **152**:375-389.
- [117] Young, L. Y., Hull, C. M. and Heitman, J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:2717-2724.

## DANKSAGUNG

---

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ulrike Schumacher, die mit unendlicher Geduld mir während der gesamten Arbeit zur Seite stand, die mich mit einer ausgezeichneten Betreuung und Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen manövrierte. Sie hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen und fand für meine Probleme immer einen Ausweg. Ihre kritische Durchsicht des Manuskriptes hat bei der endgültigen Abfassung der Arbeit entscheidend geholfen.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei Miri, die mir in zahllosen Fällen mit Rat und Tat zur Seite stand und bei Holger, mit dem ich mein Leiden bei der Erstellung der Arbeit teilen durfte.

Zu einer angenehmen Zusammenarbeit und einem hervorragendem Arbeitsklima trug die eingeschworene Pilzgruppe (Ulrike, Miri, Holger, Caro und Moni) wesentlich bei.

Mein Dank gilt auch Yvi, Oli, Christian, Stefan, Birgit und Andi, die mich während meiner Arbeit methodisch unterstützten und für die Klärung meiner Probleme immer einen guten Ratschlag parat hatten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir immer zur Seite standen und mich wo Not am Mann war unterstützen.