

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

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

**Einfluss der Fluconazol-Resistenz vermittelnden Expression  
von *MDR1* auf die Expression und Sekretion von  
Sekretorischen Aspartylproteinasen in *Candida albicans***

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

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

**vorgelegt von  
Holger Dirk Schäffler**

**aus  
Backnang**

**2007**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Löffler

**Meinen Eltern**



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Candida albicans</i>	1
1.2 Klinische Bedeutung	2
1.3 Virulenzfaktoren	3
1.4 Fluconazol	4
1.5 Fluconazol-Resistenz	5
1.6 Fluconazol-Resistenz und Pathogenität – eine ungeklärte Beziehung	8
1.7 Fragestellung	9
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Material	10
2.1.1 Geräte	10
2.1.2 Reagenzien	10
2.1.3 Oligonukleotide für PCR	11
2.1.4 Kulturmedien	11
2.1.5 Stämme	12
2.2 Methoden	13
2.2.1 Anzucht von <i>C. albicans</i>	13
2.2.2 Induktion von <i>Candida</i> -Kulturen	13
2.2.3 RNA Isolation	13
2.2.3.1 Qiagen RNeasy Kit	14
2.2.3.2 Hot-Phenol-Methode	14
2.2.3.3 MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit von EPICENTRE	15
2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	16
2.2.5 DNase Verdau	16
2.2.5.1 DNase Verdau auf Säule	16
2.2.5.2 DNase Verdau in Lösung	17
2.2.5.3 Turbo-DNase-Verdau (Ambion)	17

---

2.2.6	Reverse Transkription (RT-PCR)	17
2.2.7	Polymerase Kettenreaktion	18
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	21
2.2.10	Protein-Isolation aus <i>C. albicans</i> Zellen	22
2.2.11	Proteinase-Assay	23
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Optimierung RNA-Isolation	24
3.2	Optimierung DNase Verdau	26
3.3	Expressionsanalysen	27
3.3.1	Basale <i>MDR1</i> -Expression	27
3.3.2	<i>MDR1</i> -Expression unter <i>MDR1</i> -Induktion	28
3.3.3	Basale und BSA-induzierte <i>SAP</i> -Expression	29
3.3.4	<i>SAP</i> -Expression unter <i>MDR1</i> -Induktion	30
3.3.4.1	<i>MDR1</i> -Induktionsversuch I	32
3.3.4.2	<i>MDR1</i> -Induktionsversuch II	32
3.3.4.3	<i>MDR1</i> -Induktionsversuch III	32
3.3.4.4	<i>MDR1</i> -Induktionsversuch IV	33
3.3.4.5	Zusammenfassung der <i>MDR1</i> -Induktionsversuche	33
3.3.5	Proteinase-Aktivität und <i>SAP</i> -Expression	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>36</b>
4.1	Methodenoptimierung	36
4.2	Fluconazol-Resistenz durch konstitutive oder transiente <i>MDR1</i> -Expression	37
4.3	Basale und induzierte Genexpression	37
4.3.1	<i>MDR1</i>	38
4.3.2	Sekretorische Aspartylproteinasen	38

---

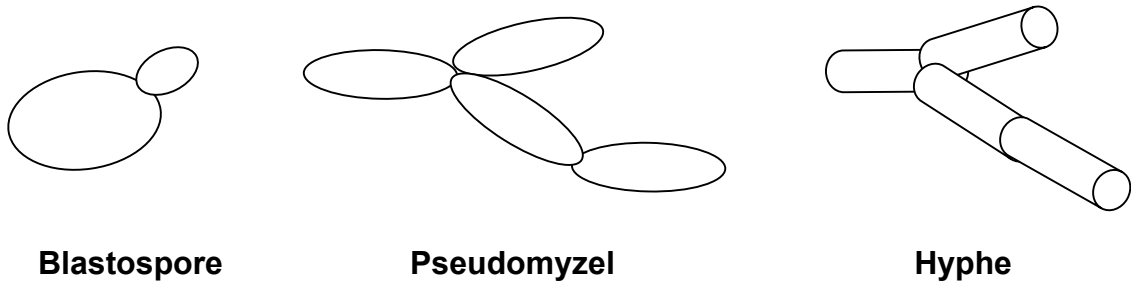
4.4	Resistenz und Pathogenität – eine bisher ungeklärte Beziehung	39
4.5	<i>MDR1</i> und <i>SAP</i> -Expression – besteht ein Zusammenhang?	41
4.5.1	Einfluss der <i>MDR1</i> -Expression auf die <i>SAP</i> -Genexpression	42
4.5.2	Einfluss von Benomyl auf die <i>SAP</i> -Genexpression	43
4.5.3	Einfluss der <i>MDR1</i> -Expression auf die <i>SAP</i> -Sekretion	43
	<b>5. Zusammenfassung</b>	46
	<b>6. Abkürzungen</b>	48
	<b>7. Literaturverzeichnis</b>	50
	<b>8. Danksagung</b>	54
	<b>9 . Lebenslauf</b>	55

## 1. Einleitung

### 1.1 *Candida albicans*

*Candida albicans* (lat. candidus: glänzend weiß; albicare: weiß sein, weiß werden) gehört als Sprosspilz zu den eukaryontischen Mikroorganismen und wird hier, da nur eine ungeschlechtliche Vermehrung bekannt ist, den Fungi imperfecti oder Deuteromycetes zugeordnet. Zusammen mit der Gattung *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Pityrosporum* bildet *Candida* die Familie der *Cryptococcaceae*. Die Gattung *Candida* umfasst etwa 150 Arten, von denen *Candida albicans* die größte humanmedizinische Bedeutung besitzt [Nolting et al., 1993; Hof et al., 2002].

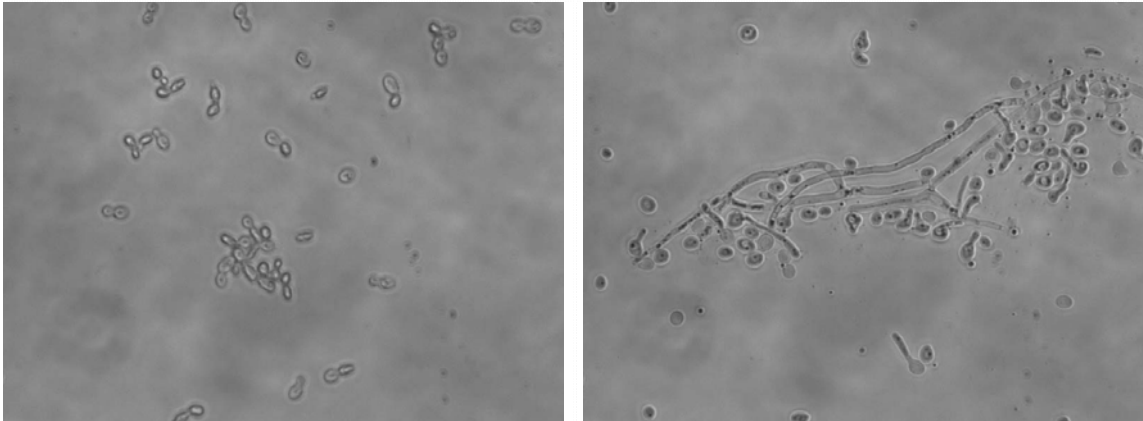
*C. albicans* zeigt drei morphologische Grundformen: Blastospore, Pseudomyzel und Hyphe (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Grundformen von *Candida albicans*

Die Blastospore (Hefezelle) ist rundlich-oval mit einem Durchmesser von ungefähr 4-10  $\mu\text{m}$ . Charakteristisch ist die Vermehrung durch Blastoconidienbildung (Sprossung). Hierbei kommt es zur Ausstülpung der Zellwand, Einwanderung eines Zellkerns in diese Ausstülpung und nach weiterem Wachstum zur Abtrennung der Zelle durch Septenbildung. Hyphen sind dagegen vielzellige, verzweigte tubuläre Strukturen. Als Myzel wird ein Geflecht von Hyphen bezeichnet. Pseudomyzel besteht aus lose miteinander verbundenen Blastosporen, die mikroskopisch wie ein Myzel erscheinen können. Die Ausbildung dieser Grundformen ist u.a. vom Nährmedium, von pH-Wert, Temperatur und vom Sauerstoffgehalt abhängig. Im infizierten Gewebe treten Hefen, Pseudomyzel und Hyphen auf (Abb. 2).





**Abbildung 2:** *Candida albicans* (Phasenkontrast)

Links: Blastosporen (YNB, Raumtemperatur); Rechts: Hyphen + Blastosporen ( Lee's Medium, 37 °C [Lee et al., 1975]).

## 1.2 Klinische Bedeutung

*Candida*-Infektionen sind am häufigsten endogenen Ursprungs. Bei der Mehrzahl der Menschen sind physiologisch geringe Keimzahlen von *C. albicans* auf Haut und Schleimhaut nachweisbar. Bei Defekten der unspezifischen und/oder spezifischen Abwehr und hier insbesondere bei Schädigungen der zellulären Immunität, als Selektionseffekt unter breiter Antibiotikatherapie, bei hormonellen Änderungen, z.B. durch Kontrazeptiva oder in der Gravidität sowie bei Stoffwechselstörungen kann es zu einer massenhaften Vermehrung von *Candida spp.* auf Haut und Schleimhäuten kommen. Als Folge dieser lokalen Vermehrung kann *C. albicans* das Gewebe invadieren und verschiedene Infektionsprozesse auslösen. Je nach Immundefizienz des Patienten können mukokutane Infektionen (Soor) oder auch lebensbedrohliche systemische Infektionsverläufe entstehen. Nach Studien aus den letzten Jahren gehört *C. albicans* mittlerweile zu den vierthäufigsten Erregern nosokomialer Septikämien, die durch hohe Mortalitätsraten von bis zu 35% gekennzeichnet sind [Wenzel 1995].

### 1.3 Virulenzfaktoren

Die Entwicklung von *C. albicans* vom normalen Kommensalen des Menschen zum Infektionserreger (Opportunismus) wird neben den oben genannten Wirtsfaktoren auch von spezifischen Merkmalen des Mikroorganismus selbst bestimmt, die die Virulenz des Erregers definieren. *C. albicans* verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die in unterschiedlicher Weise für verschiedene Prozesse in der Infektionsentwicklung von Bedeutung sind.

So stellen Adhäsine, über die eine Bindung des Erregers an spezifische Geweberezeptoren vermittelt wird, einen wichtigen ersten Schritt im Kolonisierungs- und Infektionsprozess dar. Für die Gewebeinvasion ist der Wechsel von der Hefe- in die Hyphenform (Dimorphismus) von Bedeutung. *C. albicans*-Stämme ohne die Fähigkeit zur Hyphenbildung zeigen in Tierversuchen eine deutlich verminderte Virulenz [Soll, 1992].

Weiterhin wird die Gewebeinvasion von *C. albicans* durch eine Vielzahl von sezernierten hydrolytischen Enzymen bestimmt. Zu den dabei bedeutsamen hydrolytischen Enzymen zählen Phospholipasen, Lipasen und Proteinasen. Während die Rolle der *C. albicans*-Phospholipase B für die Erregerinvasion durch mehrere Arbeiten gut belegt ist [Ghannoum, 2000; Niewerth und Korting, 2001], ist über die Rolle der Lipasen noch vergleichsweise wenig bekannt. Die Sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs), eine Gruppe von 10 Isoenzymen, sind dagegen schon seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Diese SAPs werden von einer Genfamilie (*SAP 1-10*) codiert [Hube und Naglik, 2001]. Innerhalb dieser Familie lassen sich zwei Gruppen unterscheiden, *SAP 1-3* bzw. *SAP 4-6*, deren Mitglieder untereinander 67% bzw. 89% Homologien in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen [Hube, 1996]. SAPs werden als Präproenzyme translatiert, die etwa 60 Aminosäuren länger sind als das reife Enzym. Die Sekretion dieser Proteinase erfolgt über Transportvesikel, die durch Membranabschnürung entstehen [Newport und Agabian, 1997]. Die Aktivierung und Sekretion der SAPs unterliegt einer differentiellen Regulation, die vom Stadium der Infektion und der Art der Infektion abhängig ist [Hube et al., 1994]. So dominieren Sap1p und Sap2p bei der initialen Invasion der Haut und bei der vaginalen Candidose, während die

*SAP6*-Expression die Bildung von Hyphen und Penetration in tiefere Hautschichten begleitet [Schaller et al., 2000; Felk et al., 2002]. Erhöhte Expression von *SAP4-6* wurde bei der Organinvasion nach hämatogener Disseminierung im Mausinfektionsmodell beobachtet [Staib et al., 2000].

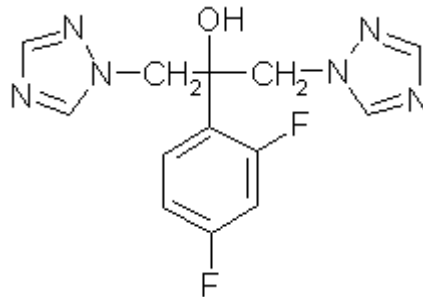
Neben dem Dimorphismus besitzen die meisten *C. albicans*-Stämme ein weiteres Entwicklungsprogramm zum reversiblen Gestaltwechsel, das Phänotypische Switching [Soll 1992]. Dieser Begriff geht auf den Wechsel in der Kolonimorphologie eines Stammes (WO-1) zurück, mit dem auch Änderungen in Genexpression, Antigenität, Adhärenz, Zellwandzusammensetzung und Antimykotikaresistenz verbunden sind [Strauss et al., 2001]. Der Dimorphismus und das Phänotypische Switching ermöglichen durch die damit verbundenen differenzierten Genaktivierungsprogramme eine schnelle und differenzierte Adaptation von *C. albicans* an unterschiedliche Habitate und Bedingungen [Soll 1992].

#### **1.4 Fluconazol**

Das Arsenal von systemisch applizierbaren Antimykotika zur Therapie invasiver Mykosen ist verglichen mit systemisch applizierbaren Antibiotika begrenzt. Neben den klassischen Polyenantimykotika (Amphotericin B), deren Anwendung durch hohe Nebenwirkungsraten kompliziert wird, hat sich in den letzten Jahren insbesondere das Triazol Fluconazol als besser verträgliche Alternative bzw. als Mittel 1. Wahl in der Therapie von *C. albicans*-Infektionen etablieren können.

Charakteristische Bestandteile des Fluconazol-Moleküls sind zwei Triazolreste, eine tertiäre Alkoholgruppe sowie ein mit zwei Fluoratomen substituierter Phenylrest (Abbildung 3). Fluconazol hemmt - ähnlich wie Imidazole - die P450-abhängige Demethylierung von Lanosterol zu Ergosterol. Angriffspunkt ist das als Cofaktor der P450-14- $\alpha$ -Lanosterol-Demethylase fungierende Häm. Die Inhibition der Demethylase führt in der Zellmembran zu einem Ergosterolmangel bei gleichzeitiger Akkumulation von anormalen Sterolen. Diese veränderte Lipidzusammensetzung bewirkt über eine Änderung der Membran-

permeabilität einen Funktionsverlust der Plasmamembran und hat somit fungistatische Wirkung.



**Abbildung 3:** Strukturformel von Fluconazol

### 1.5 Fluconazol-Resistenz

Angeichts der wenigen für die Therapie invasiver Mykosen zur Verfügung stehenden Substanzen hat jede Resistenzentwicklung, insbesondere bei dem gut verträglichen Fluconazol, große klinische Bedeutung. Seit Beginn der 90er Jahre wurden mit dem vermehrten Einsatz von Fluconazol zur Prophylaxe und Therapie von *Candida*-Infektionen zunehmend häufiger Resistenzen beobachtet [Baddley und Moser, 2004; Fan-Harvard et al., 1991].

Abzugrenzen von der primär durch Erregerigenschaften definierten Resistenz ist die „klinische Resistenz“ bzw. das Therapieversagen. Hierbei spielen Defizite in der Erregerelimination bei stark immunsupprimierten Patienten eine Rolle, ebenso wie auch Probleme der Pharmakokinetik oder Arzneimittelinteraktionen, die zur Unwirksamkeit einer Therapie mit *in vitro* effektiven Antimykotika führen können [Parente et al., 1994].

Unter epidemiologischen Gesichtspunkten kann man grundsätzlich drei Wege der Resistenzentstehung unterscheiden [Rex et al., 1995]: 1. primäre Resistenz, 2. Selektion und 3. sekundäre Resistenz. Bei der primären Resistenz tritt ein resistentes Isolat bei einem Patienten unabhängig von einer spezifischen Antimykotika-Exposition auf. Dieses scheint nach bisherigen Kenntnissen ein relativ seltenes Phänomen zu sein. Bei der Selektion wird unter dem Einfluss einer Antimykotika-Exposition aus einer Mischpopulation von

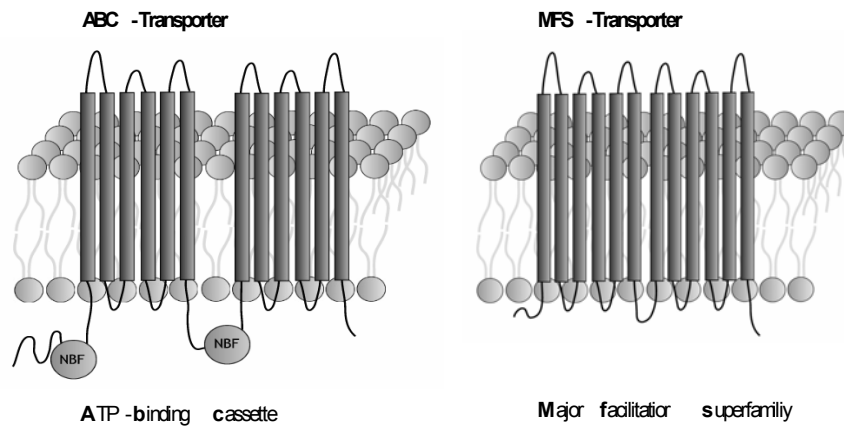
sensiblen und resistenten Stämmen die resistente Population vorherrschend. Bei der sekundären Resistenzentstehung erwirbt ein sensibler Stamm unter Antimykotika-Exposition, z.B. durch Mutation spezifische Resistenzmechanismen, oder exprimiert unter Exposition physiologisch reprimierte Resistenzgene. Selektion wird im Rahmen einer Fluconazol-Prophylaxe bzw. -Therapie häufig beobachtet und schlägt sich in den erhöhten Nachweisraten von primär resistenten Spezies wie *Candida glabrata* und *Candida krusei* nieder [Magill et al., 2006]. Sekundäre Resistenzentwicklung wird am häufigsten bei HIV-Patienten mit oropharyngealer Candidose beobachtet und steht in Zusammenhang mit hohen kumulativen Fluconazol-Dosen [Vuffray et al., 1994].

In den letzten Jahren hat man mehrere molekulare Mechanismen der Fluconazol-Resistenz bei *C. albicans* identifizieren können. Neben Änderungen des Angriffspunktes über Mutationen des *ERG11*-Genes und Überexpression des *ERG11* ist in den letzten Jahren insbesondere die Expression von Effluxpumpen-Proteinen, die eine verminderte intrazelluläre Azolkonzentration bewirken, als wichtigster Resistenzmechanismus in den Mittelpunkt des Interesses getreten.

Effluxpumpen-Proteine sind Membrantransporter, die sich durch eine breite Substratspezifität auszeichnen und viele strukturell unterschiedliche Substanzen aus der Zelle ausschleusen können. Obwohl die natürliche Funktion vieler Effluxpumpen noch nicht geklärt ist, stellen sie im Allgemeinen ein natürliches Entgiftungssystem der Zelle dar.

Innerhalb der Transportergruppe unterscheidet man zwei verschiedene Familien, die sich durch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten kategorisieren lassen. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist die für den Transport verwendete Energiequelle. Primär aktive Transporter wie die ATP-Bindungs-Cassette-Transporter (ABC-Transporter) schleusen ihre Substrate unter ATP-Hydrolyse durch die Membran. Sekundär aktive Transporter wie die

Major-Facilitator-Superfamily-Transporter (MFS-Transporter) nutzen einen Protonen- oder Ionengradienten für den Transport.



**Abbildung 4: Effluxpumpen-Proteine von Pilzen.** Links: ABC-Transporter mit zwei ATP-Binde-Domänen (NBF = nucleotide binding domain); Rechts: MFS-Transporter. Beide Transporter besitzen zwölf Membran-durchspannende Helices. (Abbildung modifiziert nach Del Sorbo et al., 2000).

Transporter der MFS-Klasse weisen 12 bis 14 Transmembrandomänen mit insgesamt 400 bis 800 Aminosäuren auf. Aufgrund von Sequenzhomologien und funktionellen Vergleichen wird die MFS-Klasse in 17 Familien unterteilt. Die physiologische Funktion der MFS-Transporter ist bisher nur unvollständig aufgeklärt, man vermutet jedoch, dass sie in erster Linie ein essentielles Entgiftungssystem der Zelle darstellen [Roohparvar et al., 2006].

Zur Resistenz gegen Fluconazol bei *C. albicans* können beide Transporter-Systeme beitragen. Als Fluconazol-Resistenz vermittelnde Transporter wurden sowohl die durch *CDR1* und *CDR2* kodierten ABC-Transporter als auch der durch *MDR1*-kodierte Transporter der MFS-Familie identifiziert [Sanglard et al., 1995; Sanglard et al., 1999; Wirsching et al., 2000]. Dabei sind die *CDR*-Transporter weniger substratspezifisch und transportieren außer Fluconazol auch andere Azolderivate, während Mdr1p Fluconazol-spezifisch ist. Unter physiologischen Bedingungen scheint die Genexpression von *CDR1*, *CDR2* und *MDR1* reprimiert zu sein, bei resistenten Isolaten können dagegen einzelne

Gene oder auch sequentiell und additiv mehrere dieser Gene hochreguliert werden.

### **1.6 Fluconazol-Resistenz und Pathogenität – eine ungeklärte Beziehung**

Für den klinischen Erfolg einer Fluconazol-Therapie sind nicht allein die in-vitro bestimmbaren MHK-Werte eines Isolates entscheidend, sondern darüber hinaus auch z.B. Virulenz charakterisierende Faktoren. Bislang gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen Azol-Resistenz und Virulenz von *Candida* untersuchten. Während *C. albicans* Stämme, die eine Resistenz gegen Fluconazol mit Überexpression von *CDR*-kodierten Effluxpumpen aufwiesen, in Tierversuchen eine reduzierte Virulenz zeigten, war bei Isolaten, deren Resistenz primär auf der Expression von *MDR1*-kodierten Proteinen beruhte, eine solche Virulenzminderung nicht feststellbar [Graybill et al., 1998]. *MDR1*-negative Mutanten wiesen sogar im experimentellen Mausmodell der invasiven Candidiasis eine reduzierte Virulenz auf [Becker et al., 1995]. Die Arbeitsgruppe von Wu wies in Kulturüberständen von Fluconazol-resistenten *C. albicans* Stämmen eine deutlich höhere *SAP2*-Aktivität nach als in Überständen von sensiblen Isolaten. Dieses Phänomen zeigte sich insbesondere bei Stämmen, in denen die Fluconazol-Resistenz vorwiegend auf der Expression von *MDR1* beruhte [Wu et al., 2000]. Die Funktion und Bedeutung der *MDR1*-kodierten Proteine für die Virulenz von *C. albicans* und die Pathogenese der Candidiasis ist jedoch noch ungeklärt.

## 1.7 Fragestellung

Ziel des Projektes war es, den Zusammenhang zwischen Azol-Resistenz vermittelnder Expression von *MDR1*-Effluxproteinen und der Expression bzw. Sekretion von Sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs) bei isogenen *MDR1*-exprimierenden, Fluconazol resistenten und nicht exprimierenden, sensiblen Stämmen sowie *MDR1*-negativen Mutanten von *Candida albicans* zu untersuchen. Dabei sollten verschiedene Aspekte in der Analyse berücksichtigt werden:

1. Verändert sich bei konstitutiver oder chemisch induzierter *MDR1*-Expression die Expression von *SAP*-Genen?
2. Wie verhält sich die extrazellulär gemessene *SAP*-Aktivität im Verhältnis zur Expression von *SAP*- mRNA unter *MDR1*-Induktion?
3. Kann ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von *MDR1* und *SAPs* auf regulatorische oder sekretorisch wirksame Einflüsse zurückgeführt werden?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	(Mini-Sub Cell GT, Sub-Cell GT)	Bio-Rad, München
Geldokumentation	(Gel Doc 1000)	Bio-Rad, München
	(BioDocAnalyse)	Whatman Biometra, Göttingen
Geltrockner	(Gel Dryer Model 583)	Bio-Rad, München
Mixer Mill M300		
PCR-Heizblock	(T3 Thermocycler)	Whatman Biometra, Göttingen
Quarzküvetten (Photometer)		Amersham Pharmacia, Freiburg
Schüttel-Heizblock	(Thermomixer comfort)	Eppendorf, Hamburg
	(Thermoshaker TS-MG)	CFL-Schuttron, Emersacker
Schüttelinkubatoren	(Multitron II, AK 82)	Infors, Bottmingen (CH)
SDS-PAGE Apparaturen	(Mini-Protean II, Mini-Protean)	Bio-Rad, München
Spannungsquellen für Elektrophorese	(PowerPac)	Bio-Rad, München
UV/Vis-Spektrophotometer	(Ultrospec 3000 pro)	Amersham, Freiburg
Western Blot Apparatur	(Mini Trans-Blot)	Bio-Rad, München

#### 2.1.2 Reagenzien

Qiagen RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit	Epicentre, Wisconsin
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Turbo DNase Kit	Ambion, Austin Texas, USA
RNAse-Free DNase Set	Qiagen, Hildesheim
DTT	
Oligo-dT-Primer	
SuperScript III Reverse Transcriptase (10000 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim
Rnase AWAY-Lösung	Roth
1 kb Plus DNA Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
BenchMark Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Benomyl	
Saures Phenol (Roti®-Phenol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	
Na-Acetat	

### 2.1.3 Oligonukleotide für PCR

Primer	Target	Sequenz [5'- 3'; forward (fd), reverse (rv)]	Quelle
MDRmsfd	<i>MDR1</i>	AATTTTACATTGCCCAATAGC	AG Candida
MDRmsrv	<i>MDR1</i>	TTATTTACCAAAGCAGTGGGG	AG Candida
BM SAP1 fd	<i>SAP1</i>	AATCAGCAGATTTCTGTAAAGGG	AG Candida
BM SAP1 rv	<i>SAP1</i>	CATAGAAAGTATGACCTTGACCG	AG Candida
EF1B fd	<i>Ef1B</i>	AGTCATTGAACGAATTCTTGC	AG Candida
EF1B rv	<i>Ef1B</i>	ATCAACTTCATCATCAGAACCG	AG Candida
ACT1Cafd	<i>Aktin</i>	ACTTTTAATGTTCCAGCTTTCTACG	AG Candida
ACT1Carev	<i>Aktin</i>	CTTTCATAGAAGATGGAGCCAA	AG Candida
SAP2 fd	<i>SAP2</i>	CTAAAGCATTCCCAGTTACTAAT	AG Candida
SAP2 rev	<i>SAP2</i>	GATGAACCACTTGGATCATATGTC	AG Candida
SAP3Nafd	<i>SAP3</i>	CCTTCTCTAAAATTATGGATTGGAAC	[Naglik et al., 2003]
SAP3Narv	<i>SAP3</i>	TTGATTTACCTTGGGGACCAGTAACATTT	[Naglik et al., 2003]
SAP4Nafd	<i>SAP4</i>	TTATTTTTAGATATTGAGCCCACAGAAA	[Naglik et al., 2003]
SAP4Narv	<i>SAP4</i>	GCCAGTGTCAACAATAACGCTAAGTT	[Naglik et al., 2003]
SAP5Nafd	<i>SAP5</i>	AGAATTTCCCGTCGATGAGACTGGT	[Naglik et al., 2003]
SAP5Narv	<i>SAP5</i>	CAAATTTTGGGAAGTGCGGGAAGA	[Naglik et al., 2003]
SAP6Nafd	<i>SAP6</i>	CCCGTTTTGAAATTAATATGCTGCTGATGG	[Naglik et al., 2003]
SAP6Narv	<i>SAP6</i>	GTCGTAAGGAGTTCTGGTAGCTTCG	[Naglik et al., 2003]

### 2.1.4 Kulturmedien

Kulturmedium	Zusammensetzung	Verwendung
YNB	Yeast-Nitrogen-Base (BD) 2% Glucose (Merck)	Standardisiertes Vollmedium für <i>C. albicans</i>
YCB	Yeast-Carbon-Base (BD)	Stickstoffmangelmedium für <i>C. albicans</i>
YCB + BSA	Yeast-Carbon-Base (BD) 1% Glucose 0,5% BSA	Proteinase-Induktion bei <i>C. albicans</i>
Lee's Medium (Lee et al., 1975)	5 g Ammoniumsulfat 0,2 g Magnesiumsulfat 2,5 g Kaliumphosphat 5 g NaCl 12,5 g Glucose 0,5 g Alanin	Induktion von Hyphenwachstum bei <i>C. albicans</i>

	1,3 g Leucin 1 g Lysin 0,1 g Methionin 0,0714 g Ornithin 0,5 g Phenylalanin 0,5 g Prolin 0,5 g Threonin 0,001 g Biotin	
Hefe-Genta-Platten	0,5 % Hefeextrakt (BD) 1 % Bacto Pepton (BD) 2 % Glucose 1,5 % Agar (Merck) 0,004 % Gentamycin (Serva)	Vollmedium in Agar- Platte für <i>C. albicans</i>

### 2.1.5 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. albicans* Stämme  $G_{sen}$  und  $G_{res}$  wurden von einem HIV-positiven Patienten isoliert, der unter periodisch wiederkehrenden oropharyngealen Candidosen litt. Die Isolate wurden entweder vor ( $G_{sen}$ ) oder während einer Fluconazolbehandlung ( $G_{res}$ ) gewonnen (Franz et al., 1998). Beim Stamm  $G_{res}\Delta MDR1$  handelt es sich um einen *MDR1*-Knockout des Stammes  $G_{res}$ , der Stamm  $WT\Delta MDR1$  ist ein *MDR1*-Knockout des Wildtypstammes WT (SC5314). Alle Stämme wurden dankenswerterweise von Prof. Joachim Morschhäuser (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2.1:** Stammsammlung

Stamm	Beschreibung	Kurzbezeichnung
SC5314	Wildtyp	WT
SFLUM	<i>MDR1</i> Knockout von SC5314	$WT\Delta MDR1$
G2	Klinisches Isolat, Fluconazol-sensibel	$G_{sen}$
G5	Klinisches Isolat, Fluconazol-resistent, konstitutive <i>MDR1</i> -Überexpression	$G_{res}$
G5M432	<i>MDR1</i> -Knockout von G5	$G_{res}\Delta MDR1$

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *C. albicans*

Für die meisten Experimente wurden *C. albicans*-Zellen in Flüssigkultur benötigt. Dafür wurde eine Vorkultur mit 5 ml YNB oder YPD-Medium über Nacht bei 200 rpm und 30 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Hauptkultur in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben angesetzt. Dabei wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:10 in warmem Medium verdünnt. Je nach Versuchsdurchführung wurden dann die Zellen für mindestens 4 h auf dem Inkubationsschüttler bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert.

### 2.2.2 Induktion von *Candida*-Kulturen

Die Induktion des Efflux-Pumpen-Gens *MDR1* erfolgte mit 50 µg/mL Benomyl (Stock 10 mg/ml in DMSO) für 1 bis 4 h.

Die Induktion der *SAP*-Gene und der Sekretion von Proteinasen erfolgte im Stickstoffmangelmedium mit Beigabe von 0,5 % BSA (YCB+BSA-Medium) für 5 Minuten bis 120 h.

### 2.2.3 RNA-Isolation

Für die Analyse der Genexpression wurde die genspezifische *messenger*-RNA (mRNA) durch Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) dargestellt.

Alle Schritte der RNA-Extraktion wurden zur Inaktivierung der ubiquitär vorkommenden RNAsen auf Eis durchgeführt, außerdem wurde in der RT-PCR nur mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) behandeltes Wasser verwendet. Weiterhin wurden vor Beginn der RNA-Isolation sämtliche Arbeitsflächen sowie potentiell kontaminierte Materialien mit RNase-Away (MBP, Molecular Bio Products) gereinigt.

Da die Zellwand von *C. albicans* mit zunehmendem Alter der Kultur durch Einlagerung sekundärer Inhaltsstoffe deutlich rigider und schwerer lysierbar

wird, wurden verschiedene RNA-Isolationsverfahren auf ihre Eignung für den Versuchsablauf getestet.

### **2.2.3.1 Qiagen RNeasy Kit**

Vor Versuchsbeginn wurde der RLT-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol komplementiert, 600  $\mu$ l Glaskügelchen in 1,5 ml Safe-Lock-Gefäße vorgelegt, dem Versuchsprotokoll entsprechend Reaktionsgefäße mit 350  $\mu$ l Ethanol vorbereitet sowie die Puffer mit 70%-igem Ethanol komplementiert.

10 ml der Hauptkultur wurden bei 4 °C mit 3500 rpm 7 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in wenig Wasser aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut pelletiert. Die Pellets wurden in je 600  $\mu$ l RLT-Puffer aufgenommen, gevortext und anschließend die Zellsuspension in die mit den Glaskügelchen vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Zur Zellwandlyse wurden die Gefäße in dem Mixer Mill M300 4 mal für je 2 min bei 30 Hz geschüttelt, wobei nach jedem Schüttelschritt die Adapter des Mixer Mills gewechselt wurden. Danach wurden die Zellreste abzentrifugiert und auf die Säule gegeben. Zur Reinigung wurden gemäß dem Herstellerprotokoll 500  $\mu$ l RPE-Puffer auf die Säule gegeben und die Reaktionsgefäße danach für 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Reinigungsschritte wurden einmal wiederholt. Der Durchlauf wurde nach den Zentrifugationsschritten jeweils verworfen. Am Ende der Reinigungsschritte wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und in die Mitte der Säule 40  $\mu$ l RNase freies Wasser pipettiert. Nach 1 min Einwirkungszeit wurde die isolierte RNA durch Zentrifugation eluiert.

### **2.2.3.2 Hot-Phenol-Methode**

Das Wirkungsprinzip dieser Methode beruht auf der chemischen Zellwandlyse durch heißes Phenol.

Es wurden ca. 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in 600  $\mu$ l TES-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS) resuspendiert. Anschließend wurden 600  $\mu$ l saures Phenol dazugegeben, gevortext und für 1 h

bei 65 °C unter wiederholtem Durchmischen auf dem Vortex alle 10 bis 15 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß für 10 s in ein Ethanol-Trockeneisgemisch getaucht und in 5 min durch Zentrifugation in zwei Phasen separiert. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 4000 rpm und 4 °C durchgeführt. Von der wässrigen Phase wurden 600 µl in ein neues Reaktionsgefäß mit 600 µl saurem Phenol überführt, die Phasen durch Invertieren vermischt und anschließend für fünf Minuten abzentrifugiert. 550 µl der wässrigen Phase wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 550 µl neutralem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gründlich vermischt und danach erneut durch Zentrifugation für 1 min separiert. 400 µl der wässrigen Phase wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml 100%igem Ethanol und 40 µl 3M Na-Acetat gemischt und für 5 min in ein Ethanol/Trockeneisgemisch getaucht. Die ausgefallene RNA wurde anschließend zum Pellet abzentrifugiert. Nach dem Waschen der RNA mit 400 µl 70%igem Ethanol und nachfolgender Zentrifugation für 3 min wurde die RNA an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde nun je nach Konzentration und Größe in DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

### **2.2.3.3 MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit von EPICENTRE**

Entsprechend den Herstellerangaben wurde zunächst der Mastermix für jede Reaktion, bestehend aus 1 µl der Proteinase K (50 µg/µl) und 300 µl Extraction Reagent vorbereitet. Es wurden ca. 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Zellpellets wurde der Mastermix zugegeben und beides durch vortexen vermischt. Anschließend wurden die Proben bei 70 °C für 15 min unter wiederholtem Durchmischen alle 5 Minuten inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden danach 10 min bei 4 °C und 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol vermischt. Die Suspension wurde anschließend 30 bis 40mal invertiert. Danach wurde die RNA durch Zentrifugation pelletiert, zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Das trockene RNA-Pellet

wurde in DEPC-Wasser resuspendiert und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt.

#### **2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und Kontrollmessung bei 280 nm. Der RNA-Gehalt der Probe errechnete sich nach folgender Formel:

Gemessener OD<sub>260</sub>-Wert x Verdünnungsfaktor x 40 µg/ml

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (Ratio) diente zur Bestimmung des Reinheitsgrades der RNA mit einem optimalen Wert bei 2,0. Ein Wert unter 1,8 wurde als Verunreinigung durch Protein interpretiert. Es wurden nur Proben mit Ratio-Werten von 1,9 bis 2,1 weiter analysiert.

#### **2.2.5 DNase Verdau**

Zur Entfernung von DNA wurde vor der RT-PCR ein DNase-Verdau durchgeführt. Zur Kontrolle wurde bei jeder RT-PCR eine DNA-spezifische PCR für das Haushaltsgen *Ef1B* mitgeführt und der DNase Verdau ggf. so lange wiederholt, bis in der Kontroll-PCR keine Amplifikation mehr nachweisbar war. Es wurden verschiedene Verfahren des DNase Verdau in Zusammenhang mit den verschiedenen RNA-Extraktionsverfahren getestet.

##### **2.2.5.1 DNase Verdau auf Säule**

Der DNase Verdau auf Säule wurde mit dem RNase-Free DNase-Set von Qiagen, Hildesheim durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden jeweils 10 µl DNase I Lösung mit 70 µl RDD-Puffer komplementiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Das Gemisch wurde dann bei der RNA-Isolationsmethode mit dem RNeasy Kit auf die Säule gegeben und die RNA wie in 2.2.3.1 beschrieben extrahiert.

### **2.2.5.2 DNase Verdau in Lösung**

Dieser DNase Verdau wurde in Anschluss an das oben beschriebene Verfahren wiederum mit dem RNase-Free DNase-Set durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase freiem Wasser auf 87,5 µl aufgefüllt, der Mastermix (10 µl RDD Puffer und 2,5 µl DNase) hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer und 250 µl 100%iges Ethanol wurde das Gemisch auf eine Säule gegeben, kurz abzentrifugiert und anschließend die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule wurde kurz zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Pufferrückstände wurden durch Leerzentrifugation von der Säule entfernt und anschließend wurde die RNA mit 50 µl Wasser und Zentrifugation für 1 min aus der Säule eluiert.

### **2.2.5.3 Turbo-DNase-Verdau (Ambion)**

50 µl der isolierten RNA wurde mit 5 µl TurboDNase-Puffer und 1 µl Turbo-DNase vermischt. Die Proben wurden für 30 bis 45 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das DNase-Inaktivierungsreagenz hinzugegeben und unter mehrmaligem Schütteln für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt bindet das DNase-Inaktivierungsreagenz an das Enzym. Der daraus entstandene Komplex wurde durch eine anschließende Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die isolierte RNA wurde sorgfältig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

### **2.2.6 Reverse Transkription (RT-PCR)**

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem SuperScript II Reverse Transcriptase Preamplification System. Es wurde immer 1 µg RNA in die RT-PCR eingesetzt. Für das Primer-Annealing wurden entsprechende Volumina der RNA-Lösung mit 1 µl Oligo-dT-Primer und DEPC-Wasser (10 µl Gesamtvolumen) gemischt



und anschließend für 10 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert, zentrifugiert und danach auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 10 µl des Mastermixes erfolgte die Amplifikation bei 42 °C im Heizblock für eine Stunde. Danach wurden die Enzyme bei 95 °C für 5 min inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde mit DEPC-Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

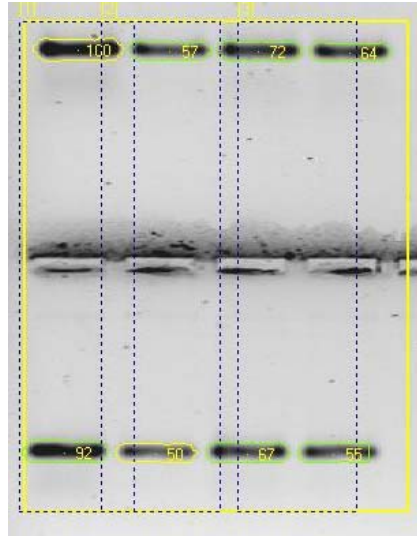
**Tabelle 2.2** : 1x Ansatz für den Mastermix der RT.

Reagenzien	Firma	1x Ansatz
5x First-Strand-Buffer	Invitrogen	4,0 µl
RNase-Out	Invitrogen	1,0 µl
DTT 0,1 M	Invitrogen	2,0 µl
Nukleotide 10 mM	Invitrogen	2,0 µl
Super Script II Reverse Transkriptase 200 U/µl	Invitrogen	1,0 µl
Gesamtmenge Mastermix pro Probe		10 µl

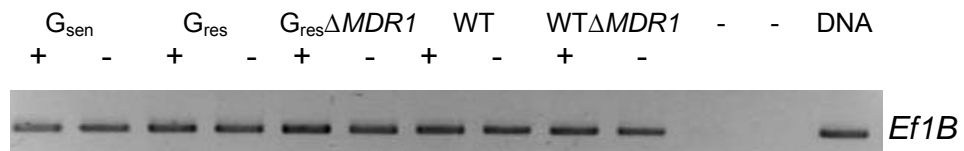
### 2.2.7 Polymerase Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde als Standard die Expression der Haushaltsgene *β-Aktin* und *Ef1B* bestimmt, von denen angenommen wird, dass sie kontinuierlich und gleichbleibend transkribiert werden. Vorteilhaft erschien bei dem Haushaltsgen *Ef1B* die Präsenz von DNA-spezifischen Introns, die bei Nachweis von zwei Banden eine DNA-Kontamination aufzeigte.

Mit allen cDNA-Proben wurde zunächst eine PCR mit dem Haushaltsgen mit wenigen Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte dieser Reaktion wurden im Doppelansatz im Gel aufgetragen und die Intensität der Banden mit dem BioDocAnalyzer von Biometra gemessen und abgeglichen (Abb 2.1). Anschließend wurde mit der abgeglichenen cDNA eine zweite PCR mit dem Haushaltsgen wie oben beschrieben durchgeführt. Erst bei gleicher Bandenintensität wurde mit der Expressionsanalyse begonnen (Abbildung 2.2). Bei jedem Analyselauf wurde eine Positivkontrolle aus genomischer *C. albicans* DNA und eine Negativkontrolle (Wasser) mitgeführt.



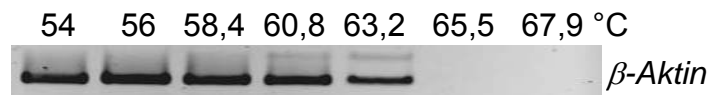
**Abbildung 2.1:** Abgleich des Haushaltsgenes mit BioDocAnalyze von Biometra.



**Abbildung 2.2:** *Ef1B*-PCR mit 21 Zyklen nach erfolgreichem Abgleich der cDNA

Das PCR-Programm wurde für das jeweilige Primer-Paar im Gradienten-Cycler optimiert, um eine maximale Sensitivität und Spezifität der spezifischen PCRs zu erreichen.

Abbildung 2.3 zeigt eine Intensitätsabnahme der  $\beta$ -Aktin-Bande ab 60,8 °C. Bei der  $\beta$ -Aktin-PCR wurde daher eine Annealing-Temperatur von 54 °C verwendet.



**Abbildung 2.3:** Annealing-Temperaturtest von  $\beta$ -Aktin.

Die optimierten Annealing-Temperaturen für die spezifischen PCRs sind in der Tabelle 2.5 zusammengefasst.

**Tabelle 2.3:** Temperaturprofil PCR.

Prozess	Dauer	Temperatur
Initialdenaturierung	5 min	95 °C
Denaturierung	30 sec	95 °C
Annealing	30 sec	siehe Tab 2.12
Elongation	30 sec	72 °C
Terminale Extension	7 min	72 °C
Zyklen	30	

**Tabelle 2.4:** Pipettierschema der PCR.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
10 x Puffer	10 x	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	unterschiedlich
dNTPs	10 mM	0,2 mM
Primer	25 µM	0,5 µM
Templat	variiert, gen. DNA oder cDNA	
Taq-DNA Polymerase	1 U/µl	0,02 U/µl
A. bidest	ad 25 µl	

**Tabelle 2.5:** Annealing-Temperaturen für PCR's.

Primer	Annealing Temperatur
<i>SAP1</i>	58 °C
<i>SAP2</i>	55 °C
<i>SAP3</i>	56 °C
<i>SAP4</i>	56 °C
<i>SAP5</i>	60 °C
<i>SAP6</i>	52 °C
<i>β-Aktin</i>	54 °C
<i>Ef1B</i>	54 °C
<i>MDR1</i>	54 °C

## 2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

**Tabelle 2.6:** Zubehör für Agarose-Gelelektrophorese.

5x Tris-Borat-Puffer (TBE)	54 g Tris base 27.5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
OrangeG Probenauftragspuffer	10 ml H <sub>2</sub> O 43,5 ml Glycerin (87%) 200 mg Orange G ad 100 ml Lagerung der 1 ml Aliquots bei -20°C
1,5 % Agarosegel	1,5 g Agarose ad 100 ml 0,5 x TBE

PCR-Produkte wurden, sofern nicht sofort weiterverarbeitet, bei -20 °C aufbewahrt. Für die Auftrennung im Agarose-Gel wurden die PCR-Produkte im Verhältnis 1:10 mit OrangeG Ladepuffer versetzt, anschließend wurden je 8 µl, sowie 5 µl einer DNA-Leiter auf ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde 45-90 min bei 90-120 V laufen gelassen, 10 min in einer Ethidiumbromid Lösung (1 µg/ml) gefärbt und danach 10 min in destilliertem Wasser entfärbt. Die Auswertung erfolgte in der Geldokumentationsanlage BioDocAnalyse (Biometra). Die Bearbeitung der gespeicherten Gelbilder wurde mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop 7.0 durchgeführt.

## 2.2.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und Kontrollmessung bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (Ratio) diente zur Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA mit einem optimalen Wertebereich zwischen 1,5 und 2,0.

### 2.2.10 Protein-Isolation aus *C. albicans* Zellen

Zur Protein-Isolation wurden jeweils die *Candida*-Zellen aus 1 ml einer logarithmisch gewachsenen Kultur sedimentiert, in 1 ml Wasser resuspendiert und mit 40  $\mu$ l Proteinasehemmer (25  $\times$  Stocklösung, Proteasehemmer „Complete“, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche) versetzt. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l 2 M NaOH + 8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, gutem Mischen und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 150  $\mu$ l eiskalte 50 % TCA hinzugegeben, wieder gut gemischt und die Proben weitere 30 min auf Eis zum Fällen der Proteine stehen gelassen. Die ausgefallenen Proteine wurden daraufhin für 30 min bei 10000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 300  $\mu$ l eiskaltem Aceton kurz und vorsichtig gewaschen und dann in 1 Vol 2  $\times$  SDS-Probenpuffer und 1 Vol Wasser aufgenommen. Für das Aufnehmen von Mdr1p-Protein wurde 2  $\times$  SDS-Probenpuffer mit Harnstoff verwendet. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert mit NaOH-Lösung eingestellt, so dass die Färbung des Indikators im SDS-Probenpuffer von Gelb wieder auf Blau wechselte.

**Tabelle 2.7:** Zubehör für SDS-Probenpuffer.

<b>2x SDS Probenpuffer</b>
100 mM Tris-HCl
200 mM DTT
4% SDS
0,2 % Bromphenolblau
20 % Glycerin
pH 6,8

### 2.2.11 Proteinase-Assay

Der Proteinase-Assay dient zum Nachweis der Proteinase-Aktivität *in vitro* [Ross et al., 1990]. Die Aktivität der Proteinasen im Überstand wird photometrisch indirekt über die Anwesenheit von Proteinfragmenten bestimmt. Dazu wurden je 1 ml der Kultur sedimentiert und 150 µl des Überstandes mit 600 µl 50 mM Natrium-Citratpuffer (pH 3,2) + BSA (1%) versetzt. Nach sorgfältigem Mischen des Ansatzes wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert; in dieser Zeit sind die zu messenden Proteinase aktiv. Nach Zugabe von 400 µl Trichloressigsäure (10%) wurden die nicht zerstörten Proteine auf Eis gefällt und im anschließenden Zentrifugationsschritt bei 1600 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert. Die Absorption der nicht gefällten Proteine wurde photometrisch bei 280 nm in einer Quarzküvette vermessen und entsprach der Aktivität der Proteinase in 150 µl Überstand.

### 3. Ergebnisse

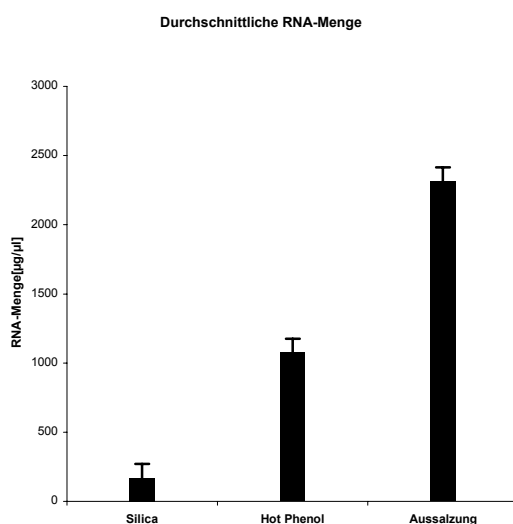
#### 3.1 Optimierung RNA-Isolation

Folgende RNA-Isolationsmethoden wurden hinsichtlich der Quantität und Qualität der isolierten RNA vergleichend getestet:

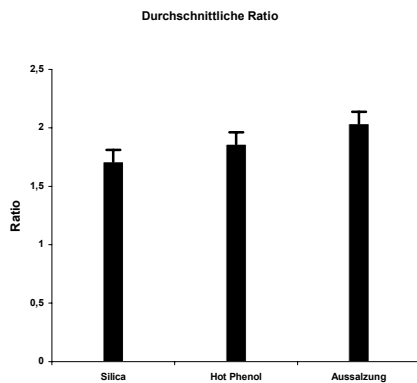
- Silica-Säulchen (Qiagen RNeasy)
- Hot Phenol Methode
- Aussalzungsverfahren (MasterPure™ Yeast RNA Purification)

Ziel war es, die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode herauszuarbeiten und miteinander zu vergleichen. Zielparameter waren jeweils Reinheit und Quantität der isolierten RNA.

In beiden Parametern stellte sich das Aussalzungsverfahren als die beste Methode heraus. So entsprach die Reinheit der isolierten RNA mit einer durchschnittlichen Ratio von 2,0 dem Zielwert, während die beiden anderen Methoden deutlich unterhalb der optimalen Ratio von 1,9-2,1 lagen (Abbildung 3.2). Auch die quantitative Ausbeute war mit durchschnittlich 2314  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNA im Aussalzungsverfahren den beiden anderen Methoden überlegen (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** RNA-Quantität (Mittelwert aus 18 Versuchen).



**Abbildung 3.2:** RNA-Ratio (Mittelwert aus 18 Versuchen).

Die Ergebnisse mit den Silica-Säulchen wiesen insgesamt die schlechtesten Werte (Ratio 1,7; Ausbeute 169  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) bei einer hohen Variabilität auf, die sich auch durch Modifizierung verschiedener Versuchsbedingungen und Zellzahleinsatz nicht verbessern ließen. Die Hot Phenol Methode zeigte zwar konstantere Ergebnisse in der RNA-Ausbeute (1075  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), hier störten aber in vielen Versuchen Phenolrückstände in den Proben, die sich insbesondere durch Inhibition der RT-PCR störend bemerkbar machten. Es gelang nicht, mit einem zusätzlichen Reinigungsschritt diese Phenolreste sicher zu eliminieren. Das Aussalzungsverfahren erwies sich somit insgesamt als zuverlässigste und darüber hinaus auch noch als zeitgünstigste Methode (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1:** Vergleich der unterschiedlichen RNA-Isolationsverfahren aus insgesamt 18 Versuchen.

	Methode	Durchschnittliche Ratio	Durchschnittliche Quantität [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Bemerkung
1	Silica-Säulchen	1,71	169,8	Reinheit und Quantität unzureichend
2	Hot Phenol	1,86	1075	Verbleibende Phenolreste interagieren mit RT-PCR
3	Aussalzungsverfahren	2,035	2314	Zufriedenstellende Ratio und Ausbeute



### 3.2 Optimierung DNase Verdau

Folgende Methoden des DNase Verdau wurden hinsichtlich ihrer Effizienz in der Elimination von DNA aus den RNA-Extraktionsprodukten durch eine Kontroll-PCR mit den RNA-Extraktionsprodukten getestet:

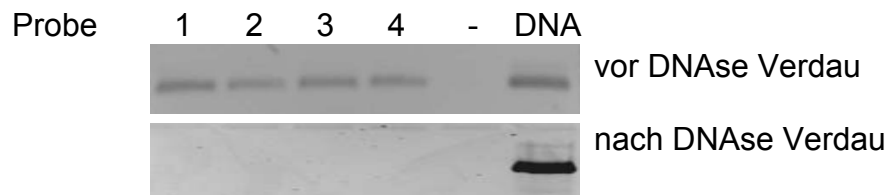
- DNase-Verdau auf der Silica-Säule
- DNase-Verdau in Lösung
- Ambion Turbo DNase

Die ersten beiden Verfahren wurden mit der Extraktion auf den Silica-Säulchen kombiniert, das dritte Verfahren kam bei allen RNA-Extraktionsprotokollen zum Einsatz. Es zeigte sich, dass ein alleiniger DNase Verdau auf der Säule nicht ausreichend war, alle DNA-Kontaminationen zu beseitigen. Das kombinierte Verfahren von DNase Verdau auf Säule und in Lösung zeigte eine verbesserte Effektivität (Abbildung 3.3). Bei hohen DNA-Konzentrationen war jedoch auch dieses kombinierte Verfahren nicht ausreichend effektiv. Gleichzeitig kam es durch den zusätzlichen DNase Schritt auch zu unerwünschten Verlusten der RNA.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
DNase Verdau auf Säule	-	-	+	+	-	-	+	+
DNase Verdau in Lösung	-	-	-	-	+	+	+	+

**Abbildung 3.3:** Vergleich des DNase Verdau auf Säule und in Lösung. *β-Aktin* Kontroll-PCR mit RNA-Extraktionsprodukten.

Dagegen gelang mit einem einmaligen Verdau durch die Ambion Turbo DNase bereits nach 20 Minuten eine vollständige Entfernung von DNA-Kontaminationen in vier RNA-Extraktionsprodukten mit einem hohen Anteil an DNA-Kontamination (Abbildung 3.4). Bei einer RNA-Konzentration von 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  war ein einmaliger DNase Verdau ausreichend und das Produkt für die RT-PCR optimal eingestellt.



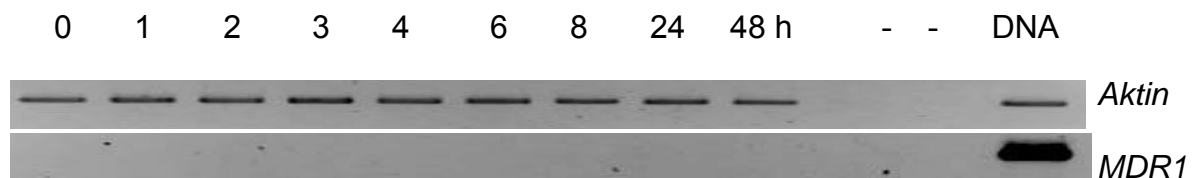
**Abbildung 3.4:** Ambion Turbo DNase Verdau,  $\beta$ -Aktin Kontroll-PCR von 4 RNA-Extraktionsprodukten mit hohem DNA-Anteil.

### 3.3 Expressionsanalysen

Der Arbeit lag die zentrale Frage zugrunde, ob die Expression des Fluconazol-Resistenz vermittelnden Gens *MDR1* Einfluss nimmt auf die Expression oder Sekretion von Sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs). Hierfür wurde zunächst die basale *MDR1*- bzw. *SAP*-Expression, sowohl bei Wildtypstämmen als auch bei klinischen Isolaten mit konstitutiver *MDR1*-Expression geprüft. Außerdem wurden die Stämme nach gezielter chemischer *MDR1*- bzw. *SAP2*-Induktion hinsichtlich ihrer Expression von *MDR1* bzw. *SAP2* analysiert. Danach wurde der Einfluß von *MDR1*-Induktion auf die *SAP*-Expression getestet. Im letzten Schritt wurde die *SAP*-Aktivität mit und ohne *MDR1*-Induktion geprüft.

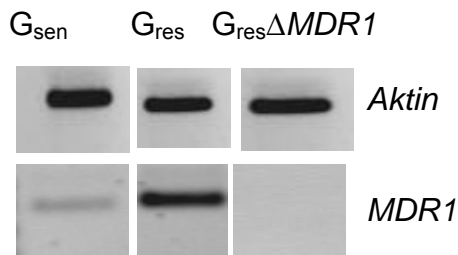
#### 3.3.1 Basale *MDR1*-Expression

Beim Wildtypstamm WT konnte innerhalb von 48 h keine *MDR1*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** *MDR1*-spezifische RT-PCR (0 - 48 h, YNB) des Stammes WT.

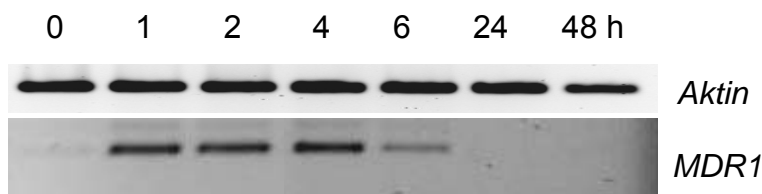
Bei der Analyse der klinischen Isolate  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$  sowie der entsprechenden  $MDR1$ -K.o.-Mutante  $G_{res}\Delta MDR1$  war nur bei dem  $MDR1$ -konstitutiv exprimierenden Stamm  $G_{res}$  ein deutliches  $MDR1$ -Signal in der RT-PCR nachweisbar (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:**  $MDR1$ -spezifische RT-PCR (1 h, YNB) der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$ .

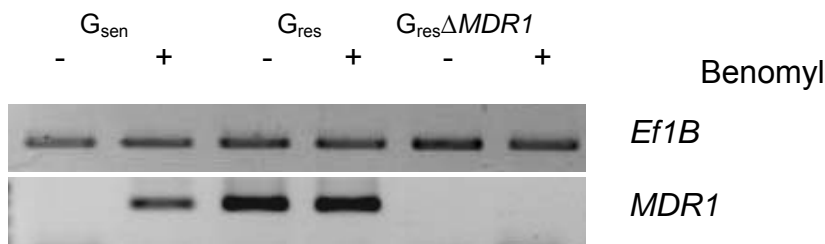
### 3.3.2 $MDR1$ -Expression unter $MDR1$ -Induktion

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der  $MDR1$ -Expression nach Benomyl-Induktion wurde eine  $MDR1$ -Expressionskinetik mit dem Wildtypstamm WT durchgeführt. In Abbildung 3.7 sieht man, dass schon nach einer Stunde ein  $MDR1$ -Signal auf dem Gel vorhanden ist, die Expression bis 4 h auf konstantem Niveau bleibt, bei 6 h schwächer wird und ab 24 h kein  $MDR1$ -Signal mehr nachweisbar ist.



**Abbildung 3.7:**  $MDR1$ -spezifische RT-PCR nach Benomyl-Induktion (0 - 48 h, YNB) des Stammes WT.

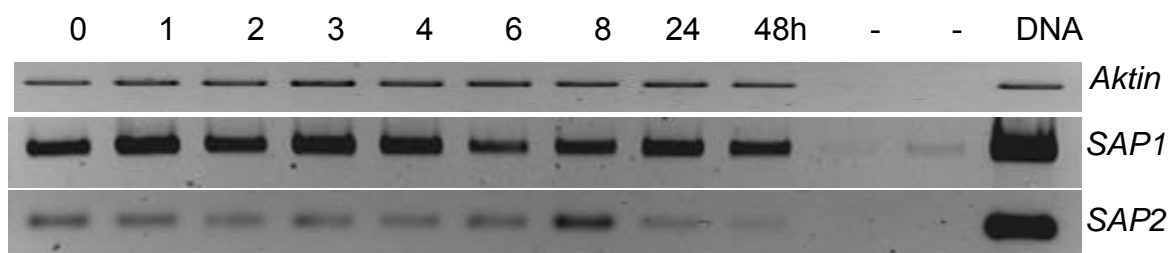
Bei der Analyse der klinischen Isolate  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$  sowie der entsprechenden  $MDR1$ -K.o.-Mutante  $G_{res}\Delta MDR1$  führte Benomyl nach 1 h Benomyl-Induktion beim Wildtypstamm  $G_{sen}$  zu einer  $MDR1$ -Expression, während die konstitutive  $MDR1$ -Expression des Stammes  $G_{res}$  nicht weiter beeinflusst wurde.  $G_{res}\Delta MDR1$  wies auch nach Induktion kein  $MDR1$ -Transkript auf (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** *MDR1*-spezifische RT-PCR nach Benomyl-Induktion (1 h, YNB) der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$ .

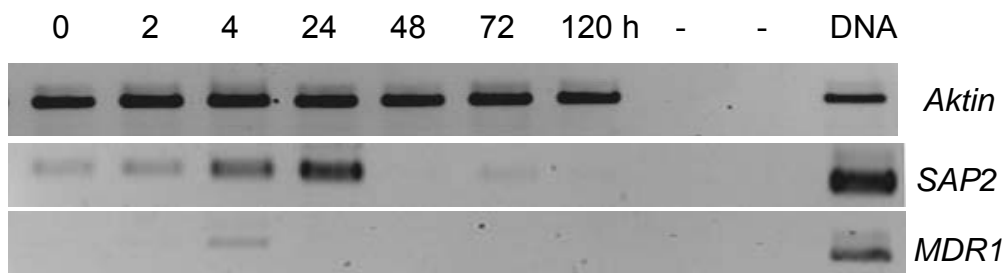
### 3.3.3 Basale und BSA-induzierte *SAP*-Expression

Im stickstoffhaltigen Vollmedium YNB wies der Wildtypstamm WT eine über 48 h konstante Expression von *SAP1* auf, während *SAP2* nicht bzw. nur schwach exprimiert wurde (Abbildung 3.9).



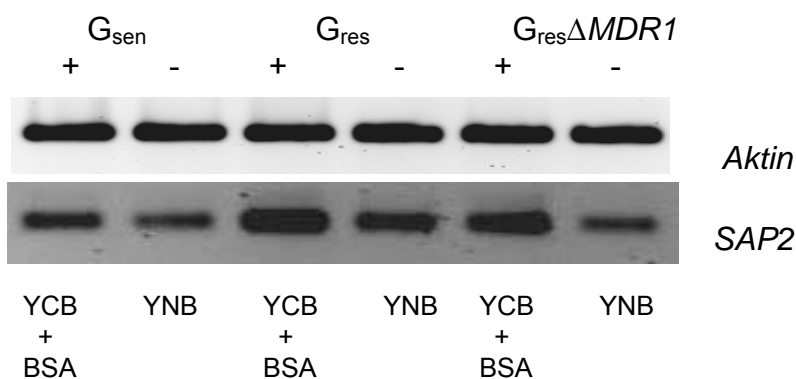
**Abbildung 3.9:** *SAP1* und *SAP2*-spezifische RT-PCR (0-48 h, YNB) des Stammes WT

Die Expression insbesondere von *SAP2* ist durch Anzucht in einem stickstoff-freien Medium (YCB) mit Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA) als einziger Stickstoffquelle effektiver zu erreichen. In einer Kinetik des Wildtypstammes WT in YCB+BSA über 48 h zeigte sich nach 4 h eine deutliche *SAP2*-Expression, die bis 24h anhielt. Bei 24 h war auch die stärkste *SAP2*-Expression nachweisbar, dieser Zeitpunkt wurde auch bei allen Induktionsexperimenten verwendet. Die *SAP2*-Induktion mit BSA zeigte nur einen sehr schwach induzierenden Effekt nach 4 h auf die Expression von *MDR1* (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10:** SAP2- und MDR1-spezifische RT-PCR nach BSA-Induktion (0 – 120 h, YCB) des Stammes WT.

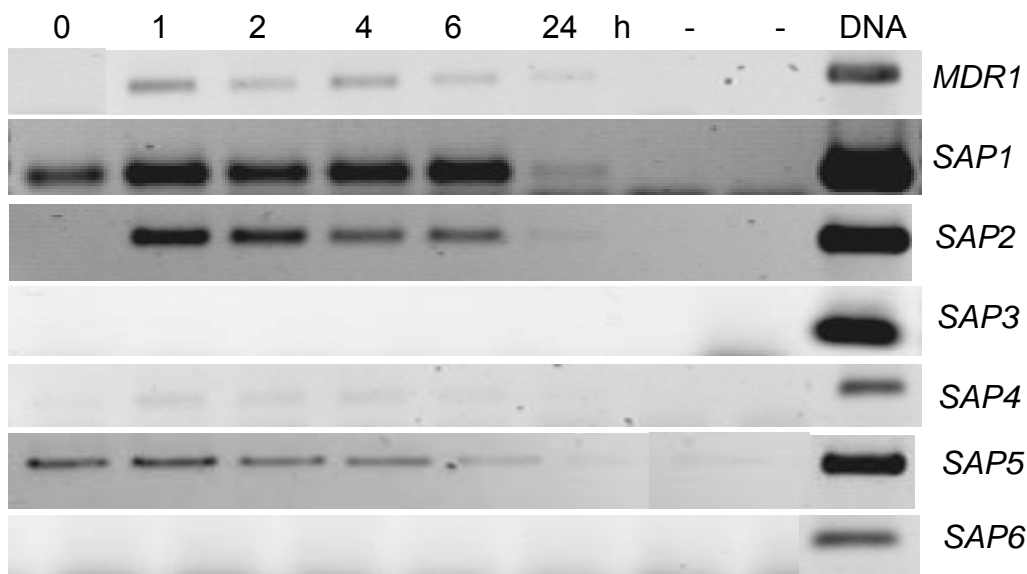
Dagegen wiesen die klinischen Isolate ( $G_{sen}$ ,  $G_{res}$ ,  $G_{res}\Delta MDR1$ ) eine stärkere basale SAP2-Expression im Vollmedium YNB auf, jedoch war auch hier die SAP2-Expression unter BSA-Induktion im Mangelmedium YCB vergleichsweise noch stärker (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11:** SAP2-spezifische RT-PCR nach BSA-Induktion (24 h, YCB+BSA) der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$ .

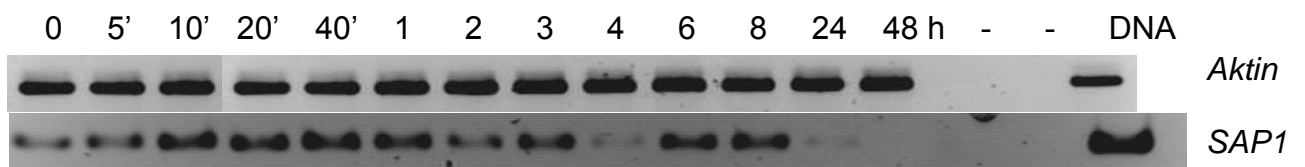
### 3.3.4 SAP-Expression unter MDR1-Induktion

Beim Wildtypstamm WT war parallel zur MDR1-Expression nach 1 bis 4 h MDR1-Induktion eine deutliche SAP2-Expression nachweisbar. SAP1 zeigte bereits ohne Induktion eine basale Expression, die jedoch parallel zur MDR1-Expression deutlich verstärkt nachweisbar war. Das SAP5-Signal zeigte sich dagegen unabhängig von der MDR1-Induktion, SAP3, SAP4 und SAP6-Gene wiesen keine Expression auf (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:** *SAP1-6* und *MDR1*-spezifische RT-PCR nach Benomyl-Induktion (0 – 24 h, YNB) des Stammes WT.

Analysen der *SAP1*-Expression in kürzeren Zeitabständen bestätigten die basale Expression, zeigten jedoch ebenfalls eine frühe (zwischen 10 min – 1 h) Expressionsverstärkung nach Benomyl-Induktion (Abbildung 3.13).

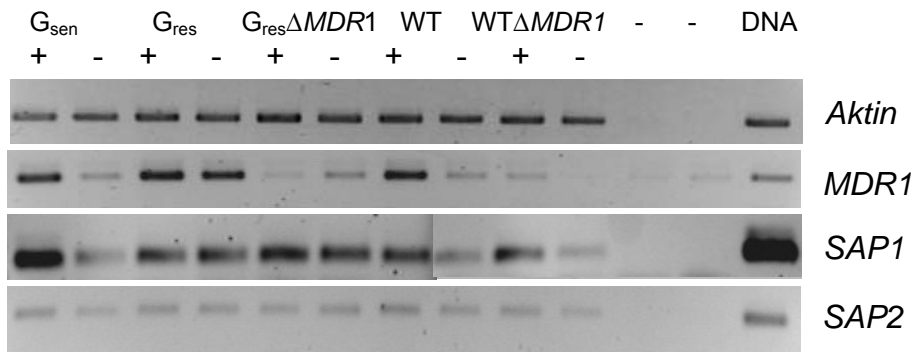


**Abbildung 3.13:** *SAP1*-spezifische RT-PCR nach Benomyl-Induktion (5 min-48 h, YNB) des Stammes WT.

Insgesamt viermal wurde im Folgenden die Expression der *SAP1*- und *SAP2*-Gene nach 1 h Benomyl-Induktion an Wildtypstämmen, klinischen Isolaten sowie korrespondierenden *MDR1*-k.o.-Mutanten geprüft (Abbildungen 3.14-3.17).

### 3.3.4.1 *MDR1*-Induktionsversuch I

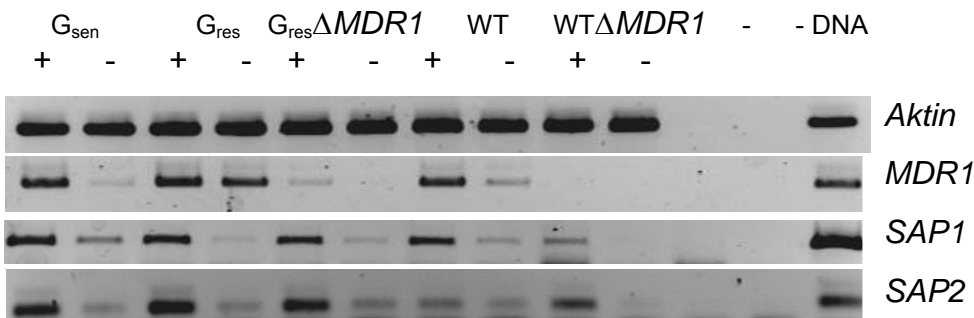
Unter *MDR1*-Induktion kam es in diesem Experiment insgesamt nur zu einer sehr schwachen *SAP2*-Expression. Bei den Stämmen  $G_{sen}$  und  $WT\Delta MDR1$  konnte eine verstärkte *SAP1*-Expression unter *MDR1*-Induktion detektiert werden.



**Abbildung 3.14:** *MDR1*-Induktionsversuch I der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$ ,  $G_{res}\Delta MDR1$ , WT und  $WT\Delta MDR1$  nach Benomyl-Induktion.

### 3.3.4.2 *MDR1*-Induktionsversuch II

In diesem Versuch konnte unter *MDR1*-Induktion sowohl eine verstärkte *SAP1*- als auch eine verstärkte *SAP2*-Expression bei allen 5 Stämmen festgestellt werden.

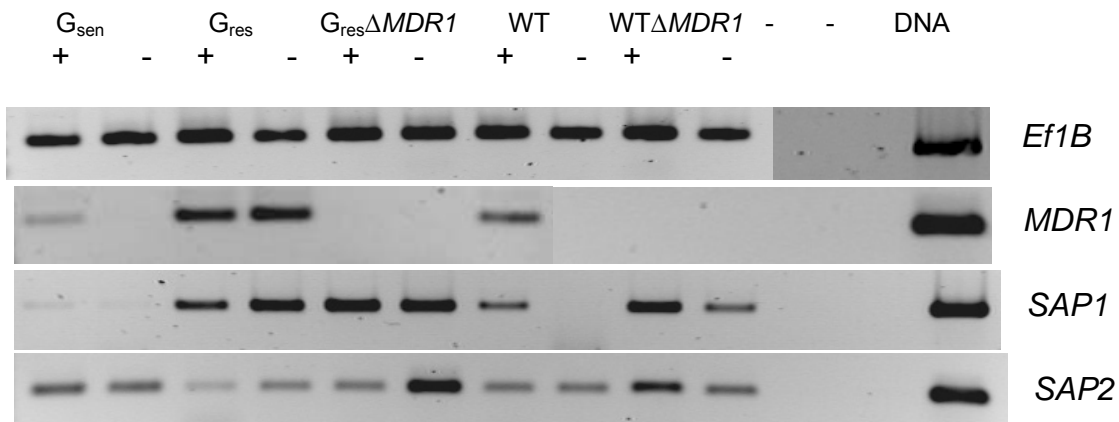


**Abbildung 3.15:** *MDR1*-Induktionsversuch II der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$ ,  $G_{res}\Delta MDR1$ , WT und  $WT\Delta MDR1$  nach Benomyl-Induktion.

### 3.3.4.3 *MDR1*-Induktionsversuch III

Beim dritten *MDR1*-Induktionsversuch war bei *SAP2* bis auf den Stamm  $WT\Delta MDR1$  keine verstärkte Expression der *MDR1*-induzierten Proben

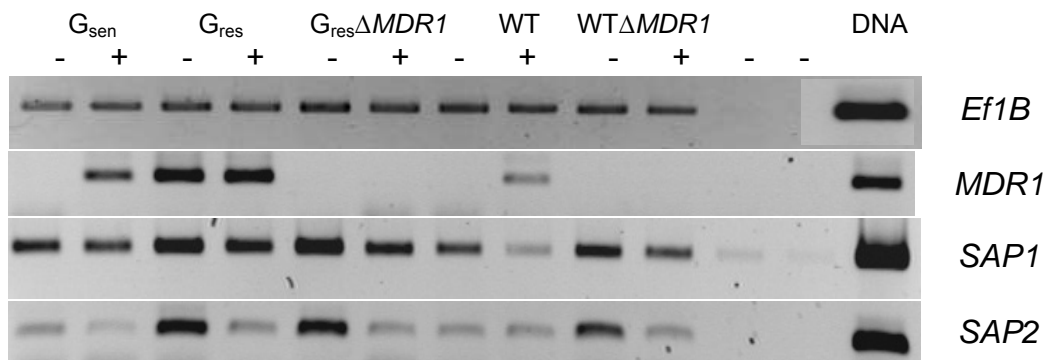
nachweisbar. Bei den Stämmen WT und  $WT\Delta MDR1$  war eine verstärkte *SAP1*-Expression unter *MDR1*-Induktion nachzuweisen.



**Abbildung 3.16:** *MDR1*-Induktionsversuch III der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$ ,  $G_{res}\Delta MDR1$ , WT und  $WT\Delta MDR1$  nach Benomyl-Induktion.

#### 3.3.4.4 *MDR1*-Induktionsversuch IV

Beim vierten *MDR1*-Induktionsversuch kam es zu keiner verstärkten *SAP1*- bzw. *SAP2*-Expression unter *MDR1*-Induktion.



**Abbildung 3.17:** *MDR1*-Induktionsversuch IV der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$ ,  $G_{res}\Delta MDR1$ , WT und  $WT\Delta MDR1$  nach Benomyl-Induktion.

#### 3.3.4.5 Zusammenfassung der *MDR1*-Induktionsversuche

In diesen Versuchen sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der *MDR1*-Induktion und der *SAP*-Expression analysiert werden. Die *MDR1*-Induktionsversuche wurden mit 5 Stämmen ( $G_{sen}$ ,  $G_{res}$ ,  $G_{res}\Delta MDR1$ , WT und



WT $\Delta$ MDR1) insgesamt viermal durchgeführt und jeweils die *SAP1* und die *SAP2*-Expression bestimmt.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde ein Schema zur Auswertung erstellt (Tab. 3.2). Hierbei wurde jeweils die RNA-Expression mit und ohne Einfluss von Benomyl als *MDR1*-Induktor für jeden Stamm vergleichend bewertet. Eine gleich starke Expression unter beiden Versuchbedingungen wurde mit 0 Punkten, eine stärkere Expression unter Benomyl mit 1 Punkt und eine schwächere Expression unter Benomyl mit -1 Punkt bewertet. Ein Summenwert aus den vier Versuchen von 2-4 Punkten wies damit auf einen induzierenden Einfluss der Induktionsbedingungen hin, Werte zwischen 1 und -1 auf Indifferenz und deutlich negative Werte von -2 bis -4 auf eine inhibierende Wirkung (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der *SAP1*-und *SAP2*-Expression über RT-PCR. Kein Unterschied zwischen Induktion und Kontrolle: 0 Punkte; Induktion > Kontrolle: 1 Punkt; Induktion < Kontrolle: -1 Punkt.

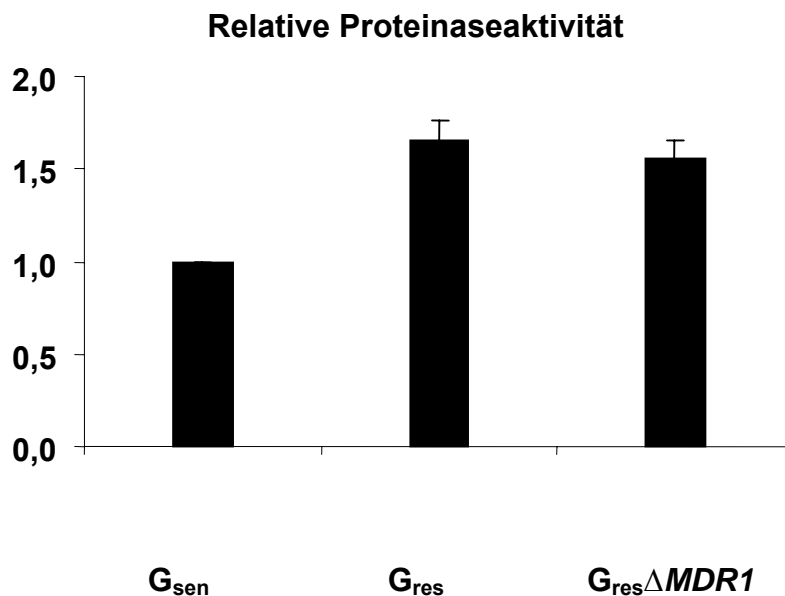
Stamm		$G_{sen}$		$G_{res}$		$G_{res}\Delta MDR1$		WT		WT $\Delta$ MDR1	
Induktion		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>MDR1</i>		+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>SAP1</i>	1	++	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)
	2	++	(+)	++	-	++	-	++	-	+	-
	3	-	-	+	++	++	++	+	-	++	+
	4	+	+	++	++	+	++	(+)	+	+	+
Punktwert		2		0		0		2		3	
<i>SAP2</i>	1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	++	(+)	++	(+)	++	(+)	(+)	(+)	+	-
	3	+	+	(+)	(+)	(+)	++	(+)	(+)	+	(+)
	4	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+
Punktwert		1		0		-1		0		1	

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur in einem der vier *MDR1*-Induktionsversuche (2. *MDR1*-Induktionsversuch, Kapitel 3.4.3.2) ein klarer Zusammenhang bei allen 5 Stämmen zwischen einer *MDR1*-Induktion und der *SAP2*-Expression ersichtlich war. Bei den anderen *MDR1*-Induktionsversuchen

war der Effekt teilweise, jedoch dann nur bei einzelnen Stämmen ersichtlich. Insgesamt lagen die Summenwerte bei allen Stämmen bezüglich *SAP2* im indifferenten Bereich. Im Gegensatz zu der *SAP2*-Expression war der Effekt einer *MDR1*-Induktion auf die *SAP1*-Expression deutlicher. Hier wiesen die beiden sensiblen Wildtypstämme ( $G_{\text{sen}}$  und WT) sowie die k.o.-Mutante  $WT\Delta MDR1$  deutlich positive Summenwerte von 2 und 3 auf.

### 3.3.5 Proteinase-Aktivität und *SAP*-Expression

Sowohl der Fluconazol-resistente Stamm  $G_{\text{res}}$  als auch die korrespondierende k.o.-Mutante  $G_{\text{res}}\Delta MDR1$  wiesen im Vergleich zum sensiblen Stamm  $G_{\text{sen}}$  eine um den Faktor 1,5 deutlich erhöhte Proteinase-Aktivität auf.



**Abbildung 3.18:** Proteinase-Aktivität der Patientenisolat  $G_{\text{sen}}$ ,  $G_{\text{res}}$  und  $G_{\text{res}}\Delta MDR1$ .

## 4. Diskussion

Ziel des Projektes war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen *MDR1*-Expression und der Produktion von Sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs) bei konstitutiv oder chemisch induzierten *MDR1*-exprimierenden Stämmen und nicht exprimierenden Wildtyp-Isolaten von *Candida albicans* zu untersuchen. Ein Effekt der *MDR1*-Expression auf die Produktion von SAPs sollte sowohl auf RNA-Ebene (Genexpression) als auch auf Protein-Ebene (Enzymaktivität) analysiert werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der *MDR1*-Expression auf die Produktion von SAPs sollte so auf eine eventuelle Beeinflussung der Regulation von *SAP*-Genen durch die Expression von Resistenzgenen oder durch Änderungen in der Enzym-Sekretion zurückgeführt werden können.

### 4.1 Methodenoptimierung

Für die Genexpressionanalysen musste zunächst eine zuverlässige Methode der RNA-Isolation mit hoher Effizienz und Reinheit etabliert werden. Dafür wurden je drei verschiedene Methoden der RNA-Isolation sowie des DNase-Verdau vergleichend geprüft.

Bei der RNA-Isolation mit Silica-Säulchen ergaben sich große Schwankungen in der RNA-Ausbeute bei einer insgesamt schlechten RNA-Qualität. Mit der klassischen Hot Phenol Methode konnten zwar zuverlässig hohe RNA-Ausbeuten erzielt werden, durch die Verwendung von Phenol kam es jedoch zu einer inhibierenden Interaktion mit den Enzymen der Reversen Transkription. Als optimale Methode stellte sich ein Aussalzungsverfahren durch ein kommerzielles Kit heraus, welches bei besten Ergebnissen bezüglich Qualität und Quantität der isolierten RNA zudem auch die kürzeste Bearbeitungsdauer beanspruchte. Eine kurze Zeitspanne in der RNA-Isolation bietet neben der Freisetzung von Arbeitszeit auch größere Sicherheit vor einer RNA-Degradierung. In Kombination mit einem einmaligen DNase-Verdau (Ambion Turbo DNase) konnten auch starke DNA-Kontaminationen in der Probe zuverlässig eliminiert werden.

---

## **4.2. Fluconazol-Resistenz durch konstitutive oder transiente *MDR1*-Expression**

Die Überexpression von Transporter-Proteinen wie Mdr1p löst in *C. albicans* Resistenz gegen Fluconazol aus [Sanglard et al., 1995]. Bei klinischen Isolaten beruht die Fluconazol-Resistenz meist auf einer konstitutiven und stabilen Überexpression von *MDR1*. Die genetischen Veränderungen, die zu dieser konstitutiven Expression von *MDR1* führen, sind derzeit noch nicht vollständig verstanden. Die Arbeitsgruppe von Wirsching konnte zeigen, dass die Promotor-Region von resistenten Stämmen keine Mutationen aufweist und führte die Überexpression von *MDR1* auf einen veränderten, nicht weiter identifizierten übergeordneten Regulationsfaktor zurück [Wirsching et al., 2000]. Daneben kann eine *MDR1*-Überexpression auch durch Exposition der Zellen mit verschiedenen Agenzien wie z.B. Benomyl, Methotrexat oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert werden [Gupta et al., 1998]. Durch diese chemischen Induktoren können neben den Transportsystemen allerdings auch weitere Gene exprimiert werden und unterliegen daher möglicherweise der Regulation durch andere Mechanismen als die der konstitutiven Überexpression [Karababa et al., 2004].

## **4.3 Basale und induzierte Genexpression**

Als Vergleichsbasis für die Expressionsanalysen zur Bestimmung des optimalen Messzeitpunktes für die Genexpression nach chemischer Induktion wurde zunächst die basale Expression von *MDR1* sowie von *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* bestimmt. Weiterhin wurde die Expressionskinetik dieser Gene nach Benomyl-Exposition beim Wildtypstamm WT ermittelt.

#### 4.3.1 *MDR1*

Die Wildtypstämme WT und  $G_{sen}$  sowie die *MDR1*-negativen Mutanten  $G_{res}\Delta MDR1$  und  $WT\Delta MDR1$  wiesen keine basale Expression von *MDR1* auf. Demgegenüber zeigte der konstitutiv exprimierende Stamm  $G_{res}$  unter denselben Bedingungen ein deutliches *MDR1*-Signal.

Die Exposition mit Benomyl führte beim Stamm WT innerhalb von 1 h bis 6 h zu einer deutlichen *MDR1*-Expression mit einem Maximum zwischen 1 h bis 4 h. Nach 24-stündiger Exposition waren keine *MDR1*-Transkripte mehr nachweisbar. Dies ist erklärbar mit einer ausreichenden Präsenz von Mdr1p-Effluxpumpen in der Zellmembran nach Hochregulation des *MDR1*-Gens, die über die Erniedrigung der intrazellulären Benomyl-Konzentration der weiteren Expression von *MDR1* gegensteuern. Eine solche transiente Hochregulation wurde für die *CDR*-kodierte Effluxpumpen bereits gezeigt [De Micheli et al, 2002]. In den weiteren Versuchen mit Benomyl-Induktion wurde daher die *MDR1*-mRNA-Expression nach 1 h ausgewertet. Unter Benomyl-Exposition zeigte auch der zweite Wildtypstamm  $G_{sen}$  ein deutliches *MDR1*-mRNA-Signal, bei der konstitutiv exprimierenden Variante  $G_{res}$  war jedoch kein weiter verstärkender Effekt erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass die chemisch induzierte, transiente *MDR1*-Expression möglicherweise über die gleichen Mechanismen vermittelt wird wie die konstitutive Überexpression. Erwartungsgemäß zeigte die *MDR1*-negative Mutante  $G_{res}\Delta MDR1$  keine Änderung unter Benomyl-Einfluss.

#### 4.3.2 Sekretorische Aspartylproteinasen

Die Analyse der basalen Expression der *SAP*-Gene zeigte beim Wildtypstamm WT eine über 48 h konstante Expression von *SAP1* und eine geringe *SAP5*-Expression. Eine Expression von *SAP2*, *SAP3*, *SAP4* und *SAP6* war nicht nachweisbar. Bei Wachstum in Vollmedien wie YNB wird *SAP2* physiologischerweise reprimiert. Durch Einsatz eines Mediums wie YCB, welches selbst keine direkte Stickstoffquelle enthält und diesen nur in Form von BSA-Zusatz anbietet, wird *SAP2* in vitro messbar exprimiert, da in erster Linie *SAP2*-Proteinasen der Zelle eine Erschließung der BSA-Stickstoffquelle

ermöglichen. *SAP2*-Transkripte waren unter diesen Versuchsbedingungen nach 4 h nur schwach erkennbar und erst nach 24 h deutlich ausgeprägt. Demgegenüber wiesen die klinischen Isolate  $G_{\text{sen}}$ ,  $G_{\text{res}}$  und  $G_{\text{res}}\Delta MDR1$  bereits eine messbare basale *SAP2*-Expression im Vollmedium auf, die jedoch ebenfalls unter BSA-Induktion im Mangelmedium verstärkt wurde, was auf eine prinzipiell gleiche Regulation der *SAP2*-Gene bei den Teststämmen hinweist. Die weiteren Induktionsversuche wurden daher in Vollmedium durchgeführt. Die Expressionskinetik der *SAP*-Gene unter Benomyl-Exposition zeigte beim Stamm WT eine Beziehung zwischen *SAP1*- und *SAP2*-Expression zur *MDR1*-Expression, die anderen *SAP*-Gene wiesen keine oder eine von der *MDR1*-Induktion unabhängige Expression auf. Daher stand in den weiteren Analysen die Beziehung von *MDR1* zu *SAP1* und *SAP2* im Mittelpunkt.

#### **4.4 Resistenz und Pathogenität – eine bisher ungeklärte Beziehung**

Die Zunahme von *Candida*-Infektionen in den letzten Jahren war auch von einem vermehrten Auftreten von Azolresistenz begleitet [Baddley und Moser, 2004]. Es haben sich daher schon einige wenige Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob das Auftreten von Azolresistenz mit einer Änderung der Virulenz verbunden ist. So stellten erstmals 1995 Becker und seine Kollegen eine Beziehung zwischen der *MDR1*-Expression und der Virulenz von *C. albicans* her. Sie zeigten in einem Mausinfektionsmodell, dass *MDR1*-Knockout-Mutanten eine verminderte Virulenz besaßen und postulierten eine pathogenetische Funktion der Effluxpumpen [Becker et al., 1995]. In folgenden Arbeiten wurden jedoch die Virulenzänderungen auf Besonderheiten in der Erstellung der Knockout-Mutanten zurückgeführt. Die hier eingesetzte Ura3-Blaster-Methodik erzeugte wachstumsdefekte, auxotrophe Mutanten [Lay et al., 1998]. Daneben beschrieb die Arbeitsgruppe von Graybill, dass *C. albicans*-Stämme, die eine Resistenz gegen Fluconazol mit Überexpression von *CDR*-kodierten Effluxpumpen aufwiesen, in Tierversuchen eine reduzierte Virulenz zeigten. Im Gegensatz dazu war bei Isolaten, deren Resistenz primär auf Expression von *MDR1*-kodierten Proteinen beruhte, eine solche

Virulenzminderung nicht feststellbar [Graybill et al., 1998]. Daraus ergibt sich die ambivalente Situation, dass gegebenenfalls ein Resistenzmechanismus (*CDR*) zu einer Virulenzminderung, die Expression eines anderen (*MDR1*) gegebenenfalls zu einer Virulenzsteigerung führen könnte, wobei in klinischen Isolaten beide Resistenzmechanismen parallel ausgeprägt sein können. Ein Zusammenhang zu definierten Pathogenitätsmerkmalen wie z.B. der Produktion von Sekretorischen Aspartylproteinasen wurde von den Arbeitsgruppen jedoch nicht untersucht.

Die Arbeitsgruppe von Wu stellte als Erste einen Zusammenhang zwischen Azolresistenz und der Produktion von Sekretorischen Aspartylproteinasen her [Wu et al., 2000]. Bei der Testung von klinischen Isolaten von HIV-Patienten mit unterschiedlich ausgeprägter Azolresistenz war in Gegenwart subinhibitorischer Fluconazol-Konzentrationen die SAP-Produktion bei Fluconazol-sensiblen Stämmen deutlich geringer ausgeprägt als bei Fluconazol-resistenten Isolaten. Empfindliche Isolate zeigten eine erhöhte intrazelluläre SAP-Aktivität, wohingegen resistente Stämme eine gesteigerte extrazelluläre SAP-Aktivität aufwiesen. Dieses Phänomen war besonders bei den Stämmen zu beobachten, deren Resistenz vorwiegend auf der Überexpression der *MDR1*-Effluxpumpe beruhte.

Den Einfluss von subinhibitorischen Konzentrationen verschiedener Antimykotika wie Itraconazol, Flucytosin und Caspofungin auf die Expression von SAPs wurde auch durch eine schottische Arbeitsgruppe bestätigt [Copping et al., 2005]. So wurde bei 7 von 8 Stämmen eine gesteigerte Expression der *SAP2*- und *SAP9*-Gene sowie eine erhöhte extrazelluläre SAP-Aktivität beobachtet. Im Gegensatz zu der Arbeit von Wu zeigte hier jedoch ein Azol-resistentes Isolat den gegenteiligen Effekt mit einer verminderten SAP-Produktion. Obwohl der Resistenzmechanismus bei den verwendeten Stämmen nicht näher dargestellt wurde, deutet die breite Azol-Resistenz der Isolate auf eine Expression von *CDR*-kodierten Effluxpumpen hin. Insgesamt konnten die Autoren jedoch keinen regelhaften Zusammenhang zwischen Azol-Resistenz und SAP-Produktion herstellen.

#### 4.5 *MDR1*- und *SAP*-Expression - besteht ein Zusammenhang?

Im Hinblick auf die Ergebnisse der oben erwähnten Arbeiten lässt sich ein Zusammenhang zwischen bestimmten Pathogenitätsfaktoren (SAPs) und definierten Resistenzmechanismen, insbesondere der Expression von *MDR1*-Effluxpumpen vermuten. Dieser mögliche Zusammenhang zwischen *MDR1*-Expression und *SAP*-Produktion sollte in dieser Arbeit genauer analysiert werden und lässt sich auf drei mögliche Hypothesen zurückführen:

1. Die Hochregulation von *MDR1* (konstitutiv/transient) verändert die Expression von *SAP*-Genen.
2. Die Induktoren für eine Hochregulation von *MDR1* wie z.B. Antimykotika oder Benomyl haben auch einen eigenen, induzierenden Effekt auf die Expression von *SAPs*.
3. Die Hochregulation von *MDR1* und Mdr1p beeinflussen die Sekretion von Sap-Proteinen.

Für die Untersuchung der Effekte im Zusammenhang mit der durch konstitutive *MDR1*-Expression ausgelösten Resistenz wurden die klinischen Isolate  $G_{\text{sen}}$ ,  $G_{\text{res}}$  und  $G_{\text{res}}\Delta\text{MDR1}$  eingesetzt. Die Stämme  $G_{\text{sen}}$  und  $G_{\text{res}}$  sind konsekutiv von einem HIV-positiven Patienten mit oropharyngealer Candidiasis isoliert worden. Nach molekularen Fingerprint-Analysen wurden die Stämme als isogen charakterisiert und sind hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens detailliert analysiert worden [Franz et al., 1998]. Dabei zeichnete sich der Stamm  $G_{\text{res}}$  im Gegensatz zu dem sensiblen Initialisolat  $G_{\text{sen}}$  durch eine vorwiegend auf *MDR1*-Überexpression beruhenden Fluconazol-Resistenz aus, deren Auslöser in Änderungen von noch nicht aufgeklärten übergeordneten Regulationsmechanismen begründet ist [Wirsching et al., 2000]. Die daraus hergestellte homozygote *MDR1*-negative Mutante  $G_{\text{res}}\Delta\text{MDR1}$  weist dieselben Veränderungen der *MDR1*-Regulation auf, ohne eine Produktion von Mdr1p. Bei der Erstellung dieser Mutante wurde eine Technik unter Verwendung von MPA-Resistenz-Selektion eingesetzt, die die oben beschriebenen Virulenzänderungen von *ura3*-negativen Mutanten vermeidet.



Zur Untersuchung der Effekte im Zusammenhang mit der durch transiente, chemische Induktion ausgelösten *MDR1*-vermittelten Resistenz wurde neben dem klinischen Wildtypisolat  $G_{sen}$  auch der Referenzstamm SC5314 (WT) eingesetzt. Dieser Stamm WT wird weltweit in *C. albicans*-Forschungsprojekten verwendet und ist phänotypisch und genetisch hervorragend charakterisiert. Die daraus erstellte homozygote *MDR1*-negative Mutante  $WT\Delta MDR1$  ist jedoch eine *ura3*-negative, auxotrophe Mutante [Morschhäuser et al., 1999].

#### 4.5.1 Einfluss der *MDR1*-Expression auf die *SAP*-Genexpression

Zur Prüfung der 1. Hypothese für die konstitutive *MDR1*-Expression wurden die Transkriptionsmuster von  $G_{res}$  mit denen von  $G_{sen}$  ohne Benomyl-Induktion verglichen. Hier zeigte der Wildtypstamm in 3 von 4 Versuchen eine geringere *SAP1*-Expression als der resistente Stamm, während sich keine signifikanten Unterschiede in der *SAP2*-Expression darstellten.

In Bezug auf die transiente Hochregulation von *MDR1* wurden die beiden Wildtypstämme  $G_{sen}$  und WT mit und ohne Benomyl-Induktion verglichen. Auch hier wurden in 2 bzw. 3 von 4 Versuchen deutlich stärkere *SAP1*-Transkripte nachgewiesen, ein Unterschied bei *SAP2* war dagegen bei beiden Stämmen nur schwach ausgeprägt.

Insgesamt zeigte sich daher sowohl bei der konstanten als auch bei der transienten Hochregulation von *MDR1* ein Zusammenhang zur Expression von *SAP1*-Genen. Ein klarer Zusammenhang zur *SAP2*-Expression war dagegen nicht darstellbar. Interessanterweise liegt das *SAP1*-Gen auf dem Chromosom 6 in der Nähe downstream vom *MDR1*-Gen, während das *SAP2*-Gen entfernt auf dem Chromosom R lokalisiert ist (<http://albicansmap.ahc.umn.edu/html/ch6.html>, 5.2.2007). Diese Nähe von *SAP1* zu *MDR1* auf demselben Chromosom könnte eine parallele Hochregulation durch denselben Regulationsfaktor erklären.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Genprodukt (Mdr1p) auf die Regulation der *SAP1*-Expression Einfluss nimmt. So aktiviert z.B. das Produkt der Expression eines der *SAP2*-Allele, die Sap2-Proteinase, die Expression des

2. *SAP2*-Allels und führt so erst zu einer vollen *SAP2*-Produktion [Staub et al., 2002]. Für diese Fragestellung wurde die *SAP1*-Expression der beiden *MDR1*-negativen Mutanten analysiert. Im Vergleich zum konstitutiv *MDR1*-exprimierenden Mutterstamm  $G_{res}$  zeigte die Mutante  $G_{res}\Delta MDR1$  keinen Unterschied in der Expression von *SAP1*. Auch die aus dem Wildtyp generierte Mutante  $WT\Delta MDR1$  verhielt sich im Vergleich zum Wildtypstamm WT unter Benomyl-Induktion hinsichtlich der *SAP1*-Expression gleich. Dies macht einen Einfluss von Mdr1p auf die Regulation von *SAP1*-Genexpression unwahrscheinlich.

#### 4.5.2 Einfluss von Benomyl auf die *SAP*-Genexpression

Die Hochregulation der *SAPs* bei den Wildtypstämmen WT und  $G_{sen}$  unter Benomyl-Exposition könnte allerdings auch auf einen direkten Einfluss von Benomyl selbst über parallele Aktivierung eines *SAP*-spezifischen Regulationsfaktors zurückzuführen sein. Zur Prüfung der Annahme, dass Benomyl selbst als Induktor für eine *SAP*-Expression, unabhängig von der *MDR1*-Induktion, fungiert, wurden die Expressionsmuster von  $G_{res}$  und der negativen Mutanten  $G_{res}\Delta MDR1$  und  $WT\Delta MDR1$  mit und ohne Benomyl-Exposition verglichen. Der Stamm  $G_{res}$  wurde gewählt, da hier eine Benomyl-Exposition zu keiner Steigerung der *MDR1*-Expression führte. Die *MDR1*-negativen Mutanten zeigen einen Benomyl-Effekt unabhängig von der *MDR1*-Expression an. Bei der Auswertung zeigten sich hier deutliche Unterschiede. Benomyl änderte nicht die *SAP1*- und *SAP2*-Expression bei den Stämmen  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$ , die *MDR1*-negative Mutante des Wildtypstammes ( $WT\Delta MDR1$ ) wies jedoch bei 3 von 4 Versuchen eine verstärkte Expression von *SAP1* unter Benomyl-Einfluss auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass der *SAP1*-induzierende Effekt von Benomyl auf Aktivierung eines Transkriptionsfaktors basiert, der gemeinsam *MDR1* und *SAP1* reguliert. Bei den Stämmen  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$  ist dieser Faktor bereits so hochreguliert, dass keine weitere Aktivierung durch Benomyl mehr erfolgt und so eine Expressionsteigerung von *SAP1* ausbleibt. Dass aber, wie vorher gezeigt, die *SAP1*-Expression der konstitutiv *MDR1*-exprimierenden Stämme im Vergleich

zu den Ausgangsisolaten deutlich verstärkt erscheint, unterstreicht die Wahrscheinlichkeit für einen gemeinsamen Regulationsfaktor der *MDR1*- und *SAP1*-Expression.

#### 4.5.3 Einfluss der *MDR1*-Expression auf die *SAP*-Sekretion

Die Aktivierung von *SAP*-Genen führt zur Synthese von Präproproteinen, die intrazellulär weiter prozessiert werden. So erfolgt zunächst im Endoplasmatischen Retikulum die enzymatische Abspaltung eines Signalpeptids, das Propeptid wird durch eine Kex2-Proteinase im Golgi-Apparat weiter modifiziert und anschließend über Transportvesikel sezerniert [Hube und Naglik, 2001; Newport und Agabian, 1997]. Die Überexpression von *MDR1* führt zu einer vermehrten Produktion des Mdr1p-Effluxpumpen-Proteins, welches in der Zellmembran von *C. albicans*-Zellen eingebaut wird. Es ist daher denkbar, dass eine verstärkte Bildung von Mdr1p und die daraus resultierenden Veränderungen der Zellmembran die Sekretion von Sap-Proteinen beeinflussen könnten. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die extrazelluläre Proteinase-Aktivität der Stämme  $G_{sen}$ ,  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$  vergleichend getestet. Der dafür eingesetzte Proteinase-Assay stellt eine bewährte und einfache Methode zur Messung von *SAP*-Aktivität *in vitro* dar [Ross et al., 1990]. In diesem Assay wiesen sowohl der Stamm  $G_{res}$  als auch die *MDR1*-negative Mutante  $G_{res}\Delta MDR1$  eine um den Faktor 1,5 höhere Proteinase-Aktivität auf als der Stamm  $G_{sen}$ . Dies lässt darauf schließen, dass die vermehrte Präsenz von Mdr1p keinen signifikanten Effekt auf die Sekretion der sekretorischen Aspartylproteinasen besitzt. Die erhöhte extrazelluläre *SAP*-Aktivität muß daher auf Änderungen auf der Transkriptionsebene beruhen. Beide Stämme mit erhöhter Proteinase-Aktivität zeigten in den Expressionsversuchen ja auch vergleichsweise höhere Expressionsraten von *SAP1*. Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls eine erhöhte Proteinaseaktivität bei Fluconazol-resistenten *C. albicans* Stämmen beobachtet, ohne jedoch Analysen auf Transkriptionsebene durchzuführen [Özkütük et al., 2003; Wu et al., 2000]. Während die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, dass die verstärkte extra-

---

zelluläre Proteinase-Aktivität vor allem durch Sekretion von Sap1-Proteinase bedingt sein muss, wurde bislang angenommen, dass die in dem Proteinase-Assay gemessene Aktivität hauptsächlich auf Sap2p zurückzuführen sei [Hube und Naglik, 2001]. Die jeweilige proteolytische Wirkung von Sap1p und Sap2p sind einander sehr ähnlich, sodass in dem angewendeten Assay keine Unterscheidung zwischen den beiden Proteinase-Isoformen möglich war. Es wäre jedoch eine interessante Aufgabe zukünftiger Projekte, die Enzymaktivität bei den Stämmen  $G_{res}$  und  $G_{res}\Delta MDR1$  z.B. durch Westernblot genauer zu charakterisieren.

## 5. Zusammenfassung

Die Zahl von invasiven *Candida albicans* Infektionen ist in den letzten Jahren erheblich angestiegen. Die parallel dazu zu beobachtende Resistenzentwicklung insbesondere gegen das gut verträgliche und in Prophylaxe und Therapie breit eingesetzte Fluconazol ist in diesem Zusammenhang von großer klinischer Bedeutung. Für den Erfolg einer Fluconazol-Therapie sind aber nicht allein die MHK-Werte eines Isolates entscheidend, sondern darüber hinaus auch die Virulenz charakterisierende Faktoren. Den wichtigsten Pathogenitätsfaktor von *C. albicans* stellt die aus 10 Isoenzymen bestehende Familie der Sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs) dar. Ziel dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen Fluconazol-Resistenz vermittelt durch Überexpression des Effluxpumpengens *MDR1* und den SAPs sowohl auf RNA-Ebene (Genexpression) als auch auf Protein-Ebene (Enzymaktivität) zu untersuchen.

Es wurden sensible Wildtypstämme, durch konstitutive und chemisch induzierte *MDR1*-Expression resistente Isolate sowie isogene *MDR1*-negative Mutanten vergleichend geprüft. Die Expression der Zielgene wurde durch RT-PCR bestimmt sowie die extrazelluläre SAP-Aktivität in einem Proteinase-Assay gemessen.

Es konnte ein Zusammenhang sowohl zwischen der konstitutiven als auch chemisch induzierten *MDR1*-Expression und der Expression von Sekretorischen Aspartylproteinase Typ 1 (*SAP1*) dargestellt werden. Die sowohl durch konstitutive als auch durch chemisch induzierte *MDR1*-Expression verstärkte Transkription von *SAP1*-Genen weist auf eine gemeinsame Regulation der beiden Gene *MDR1* und *SAP1* durch einen übergeordneten Transkriptionsfaktor hin. Ein Einfluss des Mdr1p auf Transkription und Sekretion von *SAP1* konnte dagegen ausgeschlossen werden.

Die verschiedenen SAPs werden im Verlaufe einer Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert und unterliegen einer differenzierten Regulation. Eine veränderte Expression von *SAP1* bedingt daher nicht zwangsläufig eine gesteigerte Virulenz eines *MDR1*-exprimierenden, fluconazol-resistenten

---

Stammes. Die Bedeutung der *MDR1*-assoziierten Hochregulation von *SAP1* für die Virulenz von *C. albicans* und die Pathogenese von *Candida*-Infektionen muss daher in folgenden Arbeiten geprüft werden.

---

## 6. Abkürzungen

A	Adenin
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C	Cytosin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
h	Stunde
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
spp.	Spezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

---

U	Units
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel



---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Baddley, J. W., and S. A. Moser. 2004. Emerging fungal resistance. *Clin. Lab. Med.* 24:721-735.
2. Becker, J. M., L. K. Henry, W. D. Jiang, and Y. Koltin. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect. Immun.* 63:1253-1257.
3. Copping, V.M.S., C.J. Barelle, B. Hube, N.A.R.Gow, A.J.P. Brown, F.C. Odds. 2005. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinases genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:645-654.
4. Del Sorbo, G., H. Schoonbeek, M.A. De Waard. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 30:1-15.
5. De Micheli, M., J. Bille, C. Schueller, D. Sanglard. 2002. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* 43:1197-1214.
6. Fan-Havard, P., D. Capano, S. M. Smith, A. Mangia, R. H. K. Eng. 1991. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:2302-2305.
7. Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H.C. Korting, W. Schafer, B. Hube. 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases *SAP4* to *SAP6* are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* Jul;70(7):3689-3700.
8. Franz, R., S.L. Kelly, D.C. Lamb, D.E. Kelley, M. Ruhnke, J. Morschhäuser. 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* Dec;42(12):3065-3072.
9. Ghannoum, M.A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:122-143.
10. Graybill, J. R., E. Montalbo, W. Kirckpatrick, M. F. Luther, S. G. Revankar, and T. F. Patterson. 1998. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. *Infect. Immun.* 42:2938-2942.

11. Gupta, V., A. Kohli, S. Krishnamurthy, N. Puri, S.A. Aalamgeer, S. Panwar, R. Prasad. 1998. 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.* 34:192-199.
12. Hof, H., R. Dörries. 2002. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2. korrigierte Auflage.
13. Hube, B., M. Monod, D.A. Schofield. 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology.* 14:87-99.
14. Hube, B. 1996. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr. Top. Med. Mycol.* 7:55-69.
15. Hube, B., J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147:1997-2005.
16. Karababa, M., A.T. Coste, B. Rognon, J. Bille, D. Sanglard. 2004. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3064-3079.
17. Lay, J., L.K. Henry, J. Clifford, Y. Koltin, C.E. Bulawa, J.M. Becker. 1998. Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect. Immun.* 66:5301-5306.
18. Lee, K.L., H.R. Buckley, C.C. Campbell. 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 13:148-153.
19. Magill, S.S., C. Shields, C.L. Sears, M. Choti, W.G. Merz. 2006. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.* 44(2):529-35.
20. Morschhäuser, J., S. Michel, P. Staib. 1999. Sequential gene disruption in *Candida albicans* by *FLP*-mediated site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 32:547-556.
21. Naglik, J. R, S. J. Challacombe, and B. Hube. 2003. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:400-428.

- 
22. Newport, G., N. Agabian. 1997. KEX2 influence *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J. Biol. Chem.* 14:28954-28961.
  23. Nolting, S., K. Fegeler. 1993. *Medizinische Mykologie*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York, 4. Auflage, 61-101.
  24. Niewerth, M., H.C. Korting. 2001. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 44:361-367.
  25. Özkütük, A., C. Ergon, S. Pzdemir, N. Yulug. 2003. Is there any relationship between fluconazole resistance and some virulence factors in *Candida albicans* strains? *Journal of Chemotherapy.* 15:616-617.
  26. Parente, F., S. Ardizzone, M. Cernuschi, S. Antinori, R. Esposito, M. Moroni, A. Lazzarin, G.B. Porro. 1994. Prevention of symptomatic recurrences of esophageal candidiasis in AIDS patients after the first episode: a prospective open study. *Am. J. Gastroenterol.* 86:1729-1734.
  27. Rex, J. H., M. G. Rinaldi, M. A. Pfaller. 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1-8.
  28. Roohparvar, R., M.A. De Waard, G.H.J. Kema, L.H. Zwijs. 2006. MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* Bisher nicht veröffentlicht.
  29. Ross, I.K., F. De Bernardis, G.W. Emerson, A. Cassone, P.A. Sullivan. 1990. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J. Gen. Microbiol.* 136:687-94.
  30. Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, J. Bille. 1996. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2300-2305.
  31. Sanglard, D., K. Kuchler, G. Ischer, J.L. Pagani, M. Monod, J. Bille. 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2378-2386.
  32. Schaller, M. C. Schackert, H.C. Korting, E. Januschke, B. Hube. 2000. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 114:712-717.

- 
33. Soll, D. R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 5:183-203.
  34. Staib, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof, J. Morschhauser. 2000. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:6102-6107.
  35. Staib, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof., J. Morschhäuser. 2002. Host versus in vitro signals and intrastrain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene. Mol. Microbiol. 44:1351-1366.
  36. Strauss, A., S. Michel, J. Morschhäuser. 2001. Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 183:3761-3769.
  37. Vuffray, A., C. Durussel, P. Boerlin, F. Boerlin-Petzold, J. Bille, M.P. Glauser, J.-P. Chave. 1994. Oropharyngeal candidiasis resistant to single-dose therapy with fluconazole in HIV-infected patients. AIDS 8:708-709.
  38. Wenzel, R. P. 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. Clin. Infect. Dis. 20:1531-1534.
  39. Wirsching, S., S. Michel, J. Morschhäuser. 2000a. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wildtype strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. Mol. Microbiol., 36:856-865.
  40. Wirsching, S., S. Michel, G. Kohler, J. Morschhauser. 2000b. 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. 182:400-404.
  41. Wu, T., S. Hurst, C.J. Morrison. 2000. Enhanced Extracellular Production of Aspartyl Proteinase, a Virulence Factor, by *Candida albicans* Isolates following Growth in Subinhibitory Concentrations of Fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1200-1208.

---

## 8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Tübingen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ulrike Schumacher für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung, für ihr Engagement und ihre Ratschläge, verbunden mit ihrer ständigen Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Ingo Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei der Pilzgruppe (Ulrike, Miri, Caro, Timo und Moni) bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima. Vor allem möchte ich mich bei Miri bedanken, die unermüdlich meine Fragen beantwortete.

Besonderen Dank an alle, die mir den Laboralltag erleichtert haben und natürlich auch für die Kaffeepausen: Miri, Timo, Caro, Oli Bü, Yvi, Chrischie, Hanna, Diana, Martin und Ulli.

Vielen Dank auch meinem Freund Thomas für die ständigen aufmunternden Worte.

Frau Silja Keller und Herrn Matthias Friederichs danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Oma Luise Huber für die finanzielle Hilfe bedanken.

Der allergrößte Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und in meinen Entscheidungen bestärkt haben.

---

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Holger Dirk Schäffler  
Geburtsdatum: 6.12.1980  
Geburtsort: Backnang  
Eltern: Renate und Roland Schäffler

### Schulbildung:

1987 – 1991 Grundschule Aspach  
1991 – 2000 Gymnasium in der Taus, Backnang

### Studium:

04/2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität  
Tübingen  
03/2003 Ärztliche Vorprüfung  
20.11.2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotion:

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Thema: „Einfluss der Fluconazol-Resistenz vermittelnden Expression von *MDR1* auf die Expression und Sekretion von Sekretorischen Aspartylproteinasen in *Candida albicans*“