

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von Doxorubicin auf die Expression von
Resistenzgenen und auf die Empfindlichkeit gegenüber
Fluconazol bei *Candida dubliniensis* und *Candida glabrata***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mathias Knobloch

aus Beeskow

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Ruhnke
2. Prof. Dr. O. Cornely
3. Prof. Dr. D. Buchheidt

Datum der Promotion: 24.02.2012

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
ABC	ATP-binding cassette
AGIHO	Arbeitsgemeinschaft Infektionen in der Hämatologie und Onkologie
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ALS	Agglutinin-like sequence
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BBQ	BlackBerry™ Quencher
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	Candida drug resistance
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C _T	Threshold Cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EPA	Epithelial Adhesion
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FSB	First strand buffer
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft versus host disease
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
iFKS	inaktiviertes fötales Kälberserum
MDS	Myelodysplastischen Syndrom
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MF	Major Facilitator

MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MHK _{Flu}	Minimale Hemmstoffkonzentration für Fluconazol
MHK _{Flu} ^{mod}	modifizierte Minimale Hemmstoffkonzentration für Fluconazol
mM	Millimolar
MOPS	3-N-Morpholinsulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
4NQO	4-Nitroquinolin-1-Oxid
OPC	oropharyngeale Candidose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
P-Gp	P-Glykoprotein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
SAP	sekretorische Aspartylproteasen
spp.	Spezies
Taq	Thermus aquaticus
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegment
UTP	Uridintriphosphat
VVC	vulvo-vaginale Candidose
YPD	Yeast Pepton Dextrose
YNB	Yeast Nitrogen Base
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. BIOLOGIE VON <i>CANDIDA SPP.</i>	1
1.2. <i>CANDIDA</i> ALS HUMANPATHOGENE GATTUNG	3
1.2.1. Virulenzfaktoren von <i>Candida spp.</i>	3
1.2.2. Risikofaktoren beim Menschen	4
1.3. KLINISCHE MANIFESTATIONEN UND THERAPIE EINER <i>CANDIDA</i> -INFEKTION	5
1.3.1. Mukokutane <i>Candida</i> -Infektionen	6
1.3.2. Invasive <i>Candida</i> -Infektionen	6
1.3.3. Inzidenz von <i>C. glabrata</i> und <i>C. dubliniensis</i>	7
1.3.4. Antimykotische Behandlung	8
1.4. RESISTENZMECHANISMEN BEI <i>CANDIDA SPP.</i>	11
1.4.1. Ergosterol-Biosynthese	11
1.4.2. Effluxpumpen	12
1.4.3. Andere Resistenzmechanismen	15
1.5. <i>CANDIDA SPP.</i> IN DER HÄMATOLOGIE/ONKOLOGIE	16
1.6. DOXORUBICIN UND DIE WIRKUNG AUF HUMANE UND FUNGALE ZELLEN	17
1.6.1. Einsatzgebiet und Wirkmechanismus von Doxorubicin	17
1.6.2. Die Wirkung von Doxorubicin auf humane ABC-Transporter	19
1.6.3. Die Wirkung von Doxorubicin auf Resistenzmechanismen in <i>Candida spp.</i>	21
1.7. ZIELSTELLUNG	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. MATERIAL	23
2.1.1. Mikroorganismen	23
2.1.2. Reagenzien und Lösungen	24
2.1.2.1. Kultivierung	24
2.1.2.2. RNA-Extraktion	24
2.1.2.3. cDNA-Synthese	24
2.1.2.4. RT-PCR	25
2.1.2.5. Agarose-Gelelektrophorese	25
2.1.2.6. MHK_{Flu} -Bestimmung und Chequerboard-Test	25
2.1.3. Primer	26
2.1.4. Sonden	27
2.1.5. Verbrauchsmaterialien	28
2.1.6. Geräte	28
2.2. METHODEN	29
2.2.1. Kultivierung	29
2.2.2. RNA-Extraktion	30
2.2.3. cDNA-Synthese mit DNase-Verdau	31
2.2.4. RT-PCR	31
2.2.5. Primeretablierung	35
2.2.6. MHK_{Flu} -Bestimmung	36
2.2.7. Chequerboard-Test	37
3. ERGEBNISSE	39
3.1. PRIMERETABLIERUNG UND EFFIZIENZBESTIMMUNG	39
3.2. DOXORUBICIN-EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION VON RESISTENZGENEN UND AUF DIE FLUCONAZOL-TOLERANZ BEI <i>C. DUBLINIENSIS</i>	43

3.2.1.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD/RPMI + iFKS über 90 min.....	43
3.2.2.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD über 10 Tage	44
3.2.3.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage	45
3.2.4.	MHK _{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in YPD über 10 Tage	48
3.2.5.	MHK _{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage	49
3.2.6.	Fluconazol-Doxorubicin Chequerboard-Test bei <i>C. dubliniensis</i>	49
3.3.	DOXORUBICIN-EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION VON RESISTENZGENEN UND AUF DIE FLUCONAZOL-TOLERANZ BEI <i>C. GLABRATA</i>	51
3.3.1.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD/YNB über 90 min.....	51
3.3.2.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD über 10 Tage	52
3.3.3.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage	53
3.3.4.	Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YNB über 10 Tage	54
3.3.5.	MHK _{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in YPD über 10 Tage	60
3.3.6.	MHK _{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage	61
3.3.7.	MHK _{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in YNB über 10 Tage	61
3.3.8.	Fluconazol-Doxorubicin Chequerboard-Test von <i>C. glabrata</i>	62
4.	DISKUSSION	64
4.1.	PRIMERETABLIERUNG UND EFFIZIENZBESTIMMUNG.....	64
4.2.	DOXORUBICIN-EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION VON RESISTENZGENEN UND AUF DIE FLUCONAZOL-TOLERANZ BEI <i>C. DUBLINIENSIS</i> UND <i>C. GLABRATA</i>	65
4.3.	AUSBLICK	72
5.	ZUSAMMENFASSUNG	73
6.	LITERATURVERZEICHNIS	75
7.	LEBENS LAUF	84
8.	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	86
9.	DANKSAGUNG	87

1. Einleitung

1.1. Biologie von *Candida Spp.*

Die über 150 Arten zählende Gattung *Candida* gehört zur Abteilung der Ascomyceten und zur Ordnung der Saccharomycetales (echte Hefen). *Candida spp.* sind physiologischer Bestandteil der Flora der Haut und Hautanhangsgebilden, des Oropharynx, des Gastrointestinaltraktes (GIT), der Vagina und der Urethra beim Menschen (95).



Abbildung 1: Systematik der Gattung *Candida*.

In der einzelligen Form, der sogenannten Blastospore, sind *Candida*-Zellen mikroskopisch als rundliche Zellen zu erkennen, deren Größe und charakteristische Formvariationen auf die einzelnen *Candida*-Arten schließen lässt. Durch Sprossung können sie sich asexuell vermehren und in Ketten oder in Traubenform mit der Mutterzelle verbunden bleiben. Neuere Studien deuten darauf hin, dass auch eine sexuelle Fortpflanzung möglich ist (66). Einige *Candida*-Arten können unter bestimmten Bedingungen Hyphen bilden. Die Zellen sind hier schlauchartig einander angelagert und nur durch Septen voneinander getrennt, die für den Stoffaustausch und für die Kommunikation durchlässig sein können. Im Gegensatz dazu ist die Pseudohyphenform eine Aneinanderreihung von Blastosporen, die mikroskopisch der Hyphenform ähneln kann. Hyphen bzw. Pseudohyphen können ein großes Geflecht, ein Myzel bzw. Pseudomyzel bilden.

Die Gattung *Candida* stellt eine sehr heterogene Gruppe von Spezies dar, die sich hinsichtlich ihrer phänotypischen Merkmale deutlich unterscheiden können (37). Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Arten *C. dubliniensis* und *C. glabrata* spiegeln die Heterogenität innerhalb der Gattung *Candida* wieder (Abbildung 2). So ist *C. dubliniensis* geno- und phänotypisch nah verwandt zu *C. albicans*, welche aufgrund der klinischen Bedeutung, die am besten untersuchte Art der Gattung *Candida* ist (110). Durch diese nahe Verwandtschaftsbeziehung erkannte man erst im Jahr 1995, dass es sich bei *C. dubliniensis* um eine neue *Candida*-Art handelte (102). *C. glabrata* ist dagegen mit *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) viel näher verwandt als mit *C. albicans*. So ist das Genom von *C. glabrata* haploid. Das Genom von *C. dubliniensis* und *C. albicans* ist diploid. Und während *C. glabrata* nur in der Blastosporen- und Pseudohyphenform beobachtet werden konnte, können *C. albicans* und *C. dubliniensis* Hyphen bilden. Bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist noch eine weitere Überlebensform nachgewiesen worden. Die sogenannten Chlamydosporen weisen eine verdickte Zellwand auf, die sie gegenüber Umwelteinflüssen widerstandsfähiger macht und zu einer längeren Lebenszeit führt (28).

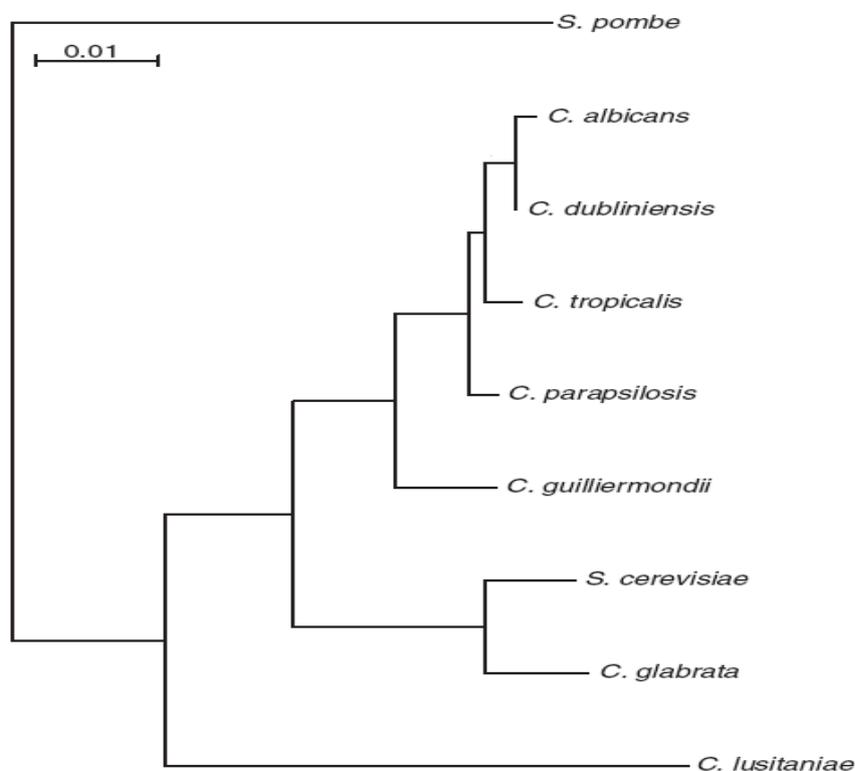


Abbildung 2: Ausschnitt aus dem Stammbaum der Gattung *Candida* (104). Die Verwandtschaftsverhältnisse basieren auf Unterschiede in den 18S rDNA-Sequenzen. *C. dubliniensis* ist ein naher Verwandter von *C. albicans*. *C. glabrata* ist hingegen nur weitläufig mit *C. albicans* verwandt. Der nächste Verwandte von *C. glabrata* ist *S. cerevisiae*.

1.2. *Candida* als humanpathogene Gattung

Infektionen mit *Candida spp.* entstehen einerseits auf der Grundlage von Virulenzfaktoren, im Sinne eines Anpassungsmechanismus an das spezifische Wirtsgewebe, andererseits auf eine verminderte Immunantwort des Wirtes, welche die unkontrollierte Vermehrung des Erregers nicht verhindern kann. Da *C. albicans* die klinisch wichtigste und am ausführlichsten untersuchte *Candida spp.* ist, wird im Folgenden auf diese *Candida spp.* Bezug genommen.

1.2.1. Virulenzfaktoren von *Candida spp.*

Zahlreiche Virulenzfaktoren sind in *Candida spp.* bekannt. Zu den wichtigsten zählt die Fähigkeit der Adhäsion von *Candida spp.* an der Wirtszelle. Diese wird durch Adhäsine der Hefezellwand ermöglicht. Adhäsine sind Polysaccharide oder Glykoproteine, die an Oberflächenstrukturen von epithelialen Zellen binden können. Eine wichtige Adhäsin-Genfamilie bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist die *agglutinin-like sequence*-Familie (ALS), bei *C. glabrata* die *epithelial adhesion*-Familie (EPA) (103). Zur Invasion in das Gewebe sezernieren *Candida spp.* verschiedene hydrolytische Enzyme, wie sekretorische Aspartylproteasen (SAP) oder Phospholipasen. Die Familie der SAP umfasst 10 Mitglieder, die im Rahmen einer Infektion mit *Candida spp.* unterschiedliche Funktionen haben. So sind die Proteasen Sap1p-3p am Abbau verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix und der Schleimhautoberfläche, wie Fibronectin, Keratin, Kollagen, Vimentin oder Laminin, beteiligt. Sap4p-6p sind hingegen mit der hyphalen Wachstumsform von *Candida spp.* assoziiert und werden vermehrt bei invasiven Infektionen sezerniert (64). *C. glabrata* produziert, im Gegensatz zu *C. dubliniensis*, keine signifikanten Mengen von SAP (38). Phospholipasen hydrolysieren die Esterverbindungen von Glycerophospholipiden. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei *C. albicans* eine gesteigerte Produktion von Phospholipasen mit einer erhöhten Virulenz verbunden ist (113). Dieser Zusammenhang wird auch bei *C. glabrata* vermutet. Jedoch werden bei *C. glabrata* und *C. dubliniensis* geringere Mengen von Phospholipasen im Vergleich zu *C. albicans* produziert (50,101). Obwohl der genaue Mechanismus der Invasion von *Candida spp.* noch nicht vollständig verstanden ist, scheint auch die Bildung von Hyphen eine wichtige Rolle zu spielen (31). *C. glabrata* ist im Gegensatz zu *C. albicans* nicht in der Lage, Hyphen zu bilden. *C. dubliniensis* ist fähig, Hyphen zu erzeugen, tut dies jedoch weniger effizient als *C. albicans* (27). Ein anderer Virulenzfaktor von *Candida spp.* ist das *phenotypic-switching*, bei dem in Abhängigkeit zu

den Erfordernissen der Umwelt der Phänotyp geändert werden kann. So konnten verschiedene Phänotypen desselben *C. glabrata*-Stammes in verschiedenen Körperregionen eines Patienten beobachtet werden (6). *C. dubliniensis* ist ebenfalls in der Lage, den Phänotyp zu ändern, was im Vergleich zu *C. albicans* öfter geschieht (33).

Die intrinsische Antimykotika-Resistenz ist ein wichtiger Faktor der Pathogenität von einzelnen *Candida spp.* So ist *C. dubliniensis* gegenüber Azolen sensibel. *C. glabrata* hingegen weist nur eine geringe Sensibilität gegenüber Azolen auf. Die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen auf künstlichen Oberflächen von zentralen Venenkathetern, Blasenkathe tern oder Herzschrittmachern ist ebenfalls ein Virulenzfaktor. Mikroskopisch liegen die *Candida*-Zellen in Biofilmen in verschiedenen Wachstumsformen vor. In der basalen Schicht überwiegt die Blastosporen-Form, während in der apikalen Schicht die hyphale und pseudohyphale Wachstumsform dominiert. Biofilme von *Candida spp.* zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Antimykotika aus (17).

Obwohl *C. glabrata* im Tiermodell eine geringere Pathogenität als *C. albicans* zeigt, ist die Letalität einer invasiven Infektion mit *C. glabrata* sehr hoch. Dies kann zum einem daran liegen, dass die Virulenzfaktoren von *C. glabrata* noch nicht ausreichend untersucht wurden (50). Zum anderen begünstigt der Einsatz von Azolen, in der antimykotischen Behandlung von Patienten mit einer schweren Grunderkrankung, die Gefahr des Auftretens einer Infektion mit *C. glabrata* gerade in dieser Patientengruppe. Im Vergleich zu *C. albicans* zeigt auch *C. dubliniensis*, trotz der engen Verwandtschaft, eine geringere Pathogenität, die in der unterschiedlichen Epidemiologie der beiden *Candida*-Arten Ausdruck findet. Dies ist nicht nur auf die oben genannten Faktoren zurückzuführen, sondern auch auf die unterschiedliche Anpassungsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen. So ist *C. dubliniensis* im Vergleich zu *C. albicans* weniger tolerant gegenüber erhöhten Temperaturen, gesteigertem Druck oder oxidativem Stress (101).

1.2.2. Risikofaktoren beim Menschen

Entscheidend für die Entwicklung einer *Candida*-Infektion ist neben den *Candida*-spezifischen Virulenzfaktoren eine herabgesetzte Immunantwort des Wirtes (70). Diese kann verschiedene Ursachen haben. Im Rahmen bestimmter Infektionskrankheiten, wie dem *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), kann das Immunsystem gestört werden. Bei Diabetes mellitus hingegen wird durch die Glykosylierung verschiedener Oberflächenproteine epithelialer Zellen die Adhärenz von *Candida spp.* verbessert (99). Neben systemischen

Erkrankungen können aber auch lokale Schädigungen der Haut oder der Schleimhäute eine *Candida*-Infektion begünstigen. So stellt das Tragen eines künstlichen Gebisses, der Konsum von Tabakwaren oder Verbrennungen der Haut ein Risiko dar (8,32,98). Eine veränderte Immunlage ist auch in bestimmten Lebensabschnitten zu beobachten. So wird die Immunabwehr in sehr hohem Alter schwächer und ist bei Frühgeborenen noch unreif (49). Bei Schwangeren wird durch die erhöhte Konzentration an weiblichen Geschlechtshormonen, die vermutlich zu einer verstärkten Adhärenz von *Candida spp.* an das vaginale Epithel sowie zu einer erhöhten Konzentration von Glykogen in der Vagina führt, das Risiko einer *Candida*-Infektion erhöht (97). Für die steigende Prävalenz von *Candida*-Infektionen sind aber im besonderen Maße iatrogen verursachte Faktoren zu nennen. Beispielsweise kann durch eine Therapie mit Breitbandantibiotika die gastrointestinale Standardflora gestört werden, so dass ein unkontrolliertes Wachstum von *Candida spp.* ermöglicht wird. Die Immunsuppression nach Transplantationen oder die Schädigung der Immunabwehr durch eine Chemo- oder Strahlentherapie kann ebenfalls der Grund einer *Candida*-Infektion sein (20,100). Aber auch chirurgische Eingriffe, zentrale Venenkatheter, Sonden für parenterale Ernährung oder eine mechanische Beatmung erhöhen das Risiko einer Infektion mit *Candida spp.* (3).

1.3. Klinische Manifestationen und Therapie einer *Candida*-Infektion

Von den mehr als 150 bekannten *Candida*-Arten sind nur wenige in der Lage, eine Erkrankung am Menschen zu verursachen. Die Quelle dieser klinisch relevanten *Candida spp.* kann endogen oder exogen sein. In der Mehrzahl der Fälle wird ein endogener Übertragungsweg angenommen, d.h. die Erreger stammen aus Körperregionen, in denen *Candida spp.* zur Standardflora zählen. Das Risiko einer *Candida*-Infektion (Candidose) ist jedoch erhöht, wenn zuvor eine lokale, klinisch nicht relevante Kolonisierung vorlag (105). Eine exogene Übertragung ist selten und erfolgt z.B. über kontaminierte parenterale Nahrungsmittel, eine sekundäre Besiedlung von Implantaten und Kathetern oder durch eine mangelnde Händedesinfektion des medizinischen Personals. Kommt es zu einer *Candida*-Infektion, wird deren Ausmaß durch die Schwere der zugrunde liegenden Schwächung des Immunsystems bestimmt. Die klinische Manifestation kann aufgrund der zahlreichen Virulenzfaktoren von *Candida spp.* und der vielfältigen Ursachen einer lokalen oder systemischen Immunschwäche sehr variabel sein und die Diagnose sowie die Therapie durch die unklaren Symptome erschweren. Eine Infektion mit *Candida spp.* kann mukokutan beschränkt sein oder invasiv verlaufen.

1.3.1. Mukokutane *Candida*-Infektionen

Bei den mukokutanen Candidosen ist die oropharyngeale Candidose (OPC) hervorzuheben, die bei HIV-positiven Patienten als eine der ersten Krankheitsmanifestationen zu sehen ist und im Verlauf als klinischer Marker für den Zustand des Immunsystems betrachtet werden kann (23). Die OPC kann in drei klinischen Manifestationsformen imponieren, die gleichzeitig auftreten können (81). Die pseudomembranöse Candidose ist gekennzeichnet durch abwischbare Beläge, die die gesamte Mundhöhle befallen können. Bei der erythematösen Candidose findet man gerötete Mukosabereiche am Gaumen und Zungenrücken. Die dritte Erscheinungsform einer OPC, die Cheilitis angularis, ist hingegen von schmerzhaften Fissuren an den Mundwinkel geprägt. Die vulvovaginale Candidose (VVC) zählt ebenfalls zu den mukokutanen Candidosen. 75 % aller Frauen leiden während ihres Lebens mindestens einmal an dieser Candidose (97). Bei HIV-infizierten Frauen stellt sie ebenfalls eine Markererkrankung dar, die der OPC vorausgehen kann (35). Candidosen der Haut und der Hautanhangsgebilde findet man bevorzugt an warmen und feuchten, interdigitalen und intertriginösen Körperstellen.

1.3.2. Invasive *Candida*-Infektionen

Eine invasive Candidose kann sich abhängig von der zugrunde liegenden Ursache in nahezu allen Organen manifestieren. Die *Candida*-Ösophagitis, die von einer OPC ausgehen kann, stellt bei HIV-Patienten mit 15-20 % eine der häufigsten Pilzinfektionen dar (2). Eine andere schwerwiegende *Candida*-Infektion ist die *Candida*-Peritonitis. Diese kann als Komplikation der Peritonealdialyse auftreten. Die Letalität liegt bei 20-30 % (56). Auch bei abdominalchirurgischen Eingriffen, die nach einer gastrointestinalen Perforation oder einer akuten Pankreatitis durchgeführt wurden, kann die *Candida*-Peritonitis eine seltene Komplikation darstellen (10). Eine *Candida*-Infektion kann sich ebenfalls in den nekrotischen Arealen nach einer akuten Pankreatitis entwickeln. Zwar ist diese deutlich seltener als eine bakterielle Infektion, verläuft aber in Bezug auf die Rate der Komplikationen, der Dauer des Krankenhausaufenthaltes und der Letalität schwerer (92). Zu den invasiven Candidosen mit einer hohen Letalität gehört auch die Candidämie. In einer Studie aus den USA wurden 4725 Patienten mit einer Sepsis zwischen 04/1995 und 06/1996 untersucht. Bei 8 % der Patienten konnte eine Candidämie nachgewiesen werden, die in 52 % der Fälle durch *C. albicans*, in 20 % durch *C. glabrata* und in 11 % durch *C. tropicalis* ausgelöst wurde. *Candida spp.* waren insgesamt die vierthäufigsten Erreger einer nosokomialen Blutinfektion (71). Eine

Candidämie ist mit einer hohen Letalität assoziiert. Die Angaben für Patienten in der Intensivstation schwanken jedoch mit 5-71 % erheblich (5). Ausgehend von einer Candidämie können auch andere Organe betroffen sein. So kann im Rahmen einer hämatogenen Streuung eine Infektion der Herzklappen auftreten. In einer Studie aus Italien wurde der Anteil von *Candida*-Endokarditiden an allen infektiösen Endokarditiden mit 1,8 % angegeben. Die Letalität lag bei 46,6 % (21). Auch die Lunge kann infolge einer Candidämie betroffen sein. Hierzu wurden in einer Studie aus Taiwan 140 Patienten mit einer Pilzpneumonie retrospektiv ausgewertet. Die *Candida*-Pneumonie stellte mit 14 % die dritthäufigste Pilzpneumonie dar. Die Letalität war mit 70 % höher als bei den anderen Pilzpneumonien (13). Im Rahmen einer Candidämie kann sich auch eine ZNS-Candidose ausbilden, die sich am häufigsten in Form von Mikroabszessen manifestiert. Diese *Candida*-Infektion tritt auch als Komplikation von neurochirurgischen Eingriffen auf, hier jedoch eher in Form einer Meningitis (84). Durch eine hämatogene Streuung der Erreger kann auch die Chorioidea betroffen sein und sich eine Chorioretinitis ausbilden. Wenn zusätzlich der Glaskörper befallen wird, spricht man von einer Endophthalmitis. Die Angaben zur Inzidenz schwanken erheblich. So wurde diese für die Endophthalmitis bei Patienten mit einer Candidämie mit 2-40 % angegeben (36). Die Letalität von Patienten mit einer *Candida*-Endophthalmitis ist mit 77-80 % sehr hoch (41). Vorzugsweise bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien kann auch die Leber von *Candida spp.* befallen werden. In der Leberultrasonographie sind dann runde demarkierte Areale zu erkennen. Die hepato lienale Candidose wird auch als chronisch-disseminierte *Candida*-Infektion bezeichnet. Der Nachweis von *Candida spp.* im Magen-Darm-Trakt oder in den ableitenden Harnwegen ist zunächst nicht pathologisch. Die Unterscheidung zwischen einer Kolonisierung und einer klinisch relevanten Infektion kann anhand der Keimzahlmenge im Stuhl bzw. Urin getroffen werden.

1.3.3. Inzidenz von *C. glabrata* und *C. dubliniensis*

In zunehmendem Maße geraten neben *C. albicans* auch andere, sogenannte Nicht-*C. albicans spp.* durch ihre steigende klinische Prävalenz in den Fokus intensiver Forschungen (45,80). Zu ihnen gehören neben *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* auch die in dieser Arbeit untersuchten Stämme *C. glabrata* und *C. dubliniensis*. *C. glabrata* kann sowohl bei mukokutanen als auch bei invasiven Candidosen beobachtet werden. Bei den mukokutanen Candidosen ist hier besonders die VVC zu erwähnen. Die Inzidenz von *C. glabrata* als Auslöser dieser Infektion ist in den letzten Jahren gestiegen, so dass

C. glabrata mittlerweile der häufigste Nicht-*C. albicans* Erreger einer VVC ist. Bei der OPC spielt *C. glabrata* dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Der Erreger ist hier meist als Mischinfektion mit *C. albicans* zu finden (22). Die Inzidenz von Candidämien, die durch *C. glabrata* ausgelöst wurden, ist in den letzten Jahren ebenfalls gestiegen. Sie lag in den USA 1992 bei 14 % aller Candidämien. 10 Jahre später ist dieser Wert auf 18 % gestiegen. Neuere Studien geben die Inzidenz der durch *C. glabrata* ausgelösten Candidämien mit 24 % an. Damit ist *C. glabrata* die am zweithäufigsten nachgewiesene *Candida spp.* im Rahmen einer Candidämie (50). *C. dubliniensis* ist hingegen nur sehr selten bei invasiven Candidosen zu finden. Diese *Candida spp.* wird am häufigsten als Erreger einer OPC bei HIV- bzw. AIDS-Patienten nachgewiesen. In einer irischen Studie wurde die Inzidenz in diesem Zusammenhang mit 26 bzw. 32 % angegeben. In bis zu 90 % der Fälle trat *C. dubliniensis* als Mischinfektion mit anderen *Candida spp.* auf (101).

1.3.4. Antimykotische Behandlung

Zur Therapie von *Candida*-Infektionen stehen verschiedene Medikamentengruppen zur Verfügung. Die älteste ist die der Polyen-Antimykotika mit dem Hauptvertreter Amphotericin B. Amphotericin B bindet an das Ergosterol der Zytoplasmamembran der *Candida*-Zelle, welche dadurch durchlässiger wird. Die Wirkung ist fungizid. Da aber Amphotericin B nicht nur an das Ergosterol von Pilzzellen, sondern auch an menschlichen Sterolen binden kann, können zum Teil schwere Nebenwirkungen auftreten. In den letzten Jahren wurden verschiedene Lipidformulierungen von Amphotericin B wie dem liposomalen Amphotericin B entwickelt, die ein deutlich besseres Nebenwirkungsprofil bei gleicher Wirksamkeit aufweisen (59).

Die Gruppe der Azole ist die am häufigsten verwendete antimykotische Substanzklasse. Sie hemmt die durch das *ERG11*-Gen kodierte Lanosterol 14- α -Demethylase, welche die Umwandlung von Lanosterol in 14- α -Demethyl-Lanosterol katalysiert (Abbildung 3). Die fungistatische Wirkung wird durch die Akkumulierung von toxischen Vorstufen der Ergosterol-Biosynthese sowie durch das Fehlen von Ergosterol in der Zellmembran hervorgerufen.

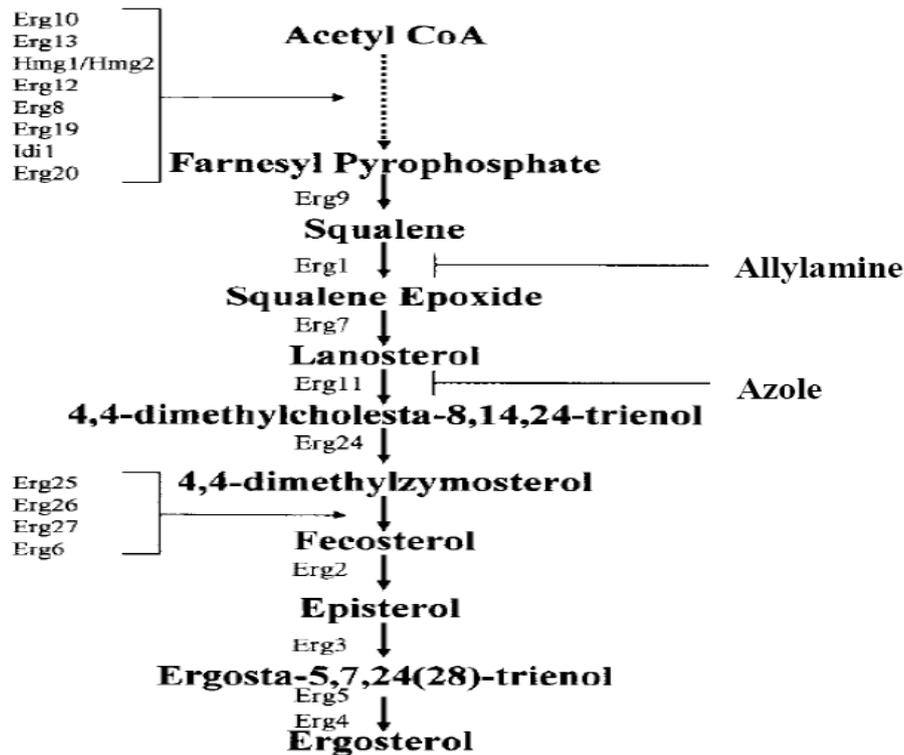


Abbildung 3: Ergosterol-Biosynthese in der *Candida*-Zelle. Allylamine hemmen die Squalenepoxidase, welche durch *ERG1* kodiert wird. Azole hemmen die Lanosterol 14- α -Demethylase, welche durch *ERG11* kodiert wird (68).

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe von Antimykotika ist das in dieser Arbeit verwendete Fluconazol. Es gehört zur ersten Generation der Azol-Antimykotika und weist ein großes Einsatzspektrum auf. So wird Fluconazol zur Prophylaxe einer *Candida*-Infektion bei allogener Knochenmark- und Stammzelltransplantation empfohlen (96). Zudem wird Fluconazol zur Therapie von invasiven Candidosen verwendet, bei denen zuvor eine Sensibilitätstestung erfolgt ist, da hier Durchbruchinfektionen mit *C. glabrata* und *C. krusei* beobachtet werden konnten (29). *C. glabrata* ist dosisabhängig sensibel und *C. krusei* ist resistent gegenüber Fluconazol. Andere Azol-Antimykotika wie Itraconazol, Voriconazol oder Posaconazol zeichnen sich durch ein größeres Wirkspektrum als Fluconazol aus (Abbildung 4). Itraconazol wird vorwiegend zur Behandlung einer OPC oder VVC verwendet. Voriconazol wird in der Therapie von fluconazolresistenten invasiven Candidosen in nicht-neutropenischen Patienten empfohlen (47). Posaconazol wird hauptsächlich zur Prophylaxe bei Patienten eingesetzt, die eine Chemotherapie gegen eine akute myeloische Leukämie (AML) oder einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) erhalten und neutropenisch sind sowie nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation mit einer Graft versus Host Disease (GvHD) (14).

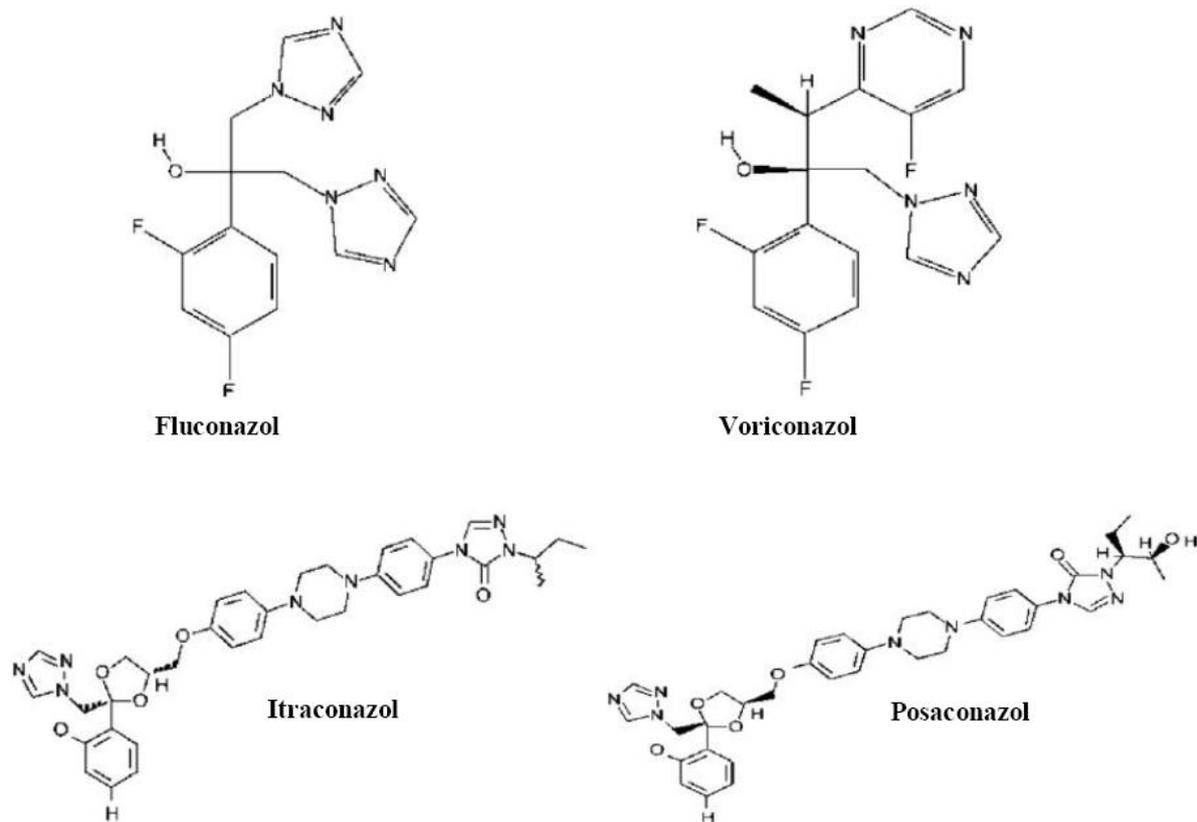


Abbildung 4: Strukturformel von Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol und Posaconazol (114).

Eine andere Gruppe von Antimykotika, die Allylamine mit den Hauptvertretern Terbinafin und Naftifin, inhibieren die Squalenepoxidase (Abbildung 3). Die fungizide Wirkung wird vermutlich durch die Akkumulation von Squalen in der Pilzzelle bewirkt. Allylamine werden vorwiegend zur Behandlung kutaner Candidosen eingesetzt. Terbinafin kann aber auch bei invasiven Candidosen zum Einsatz kommen.

Medizinische Verwendung im klinischen Alltag findet auch die Gruppe der Pyrimidine, mit 5-Flucytosin als den wichtigsten Vertreter. 5-Flucytosin wird in der *Candida*-Zelle zu 5-Fluor-UTP umgesetzt. 5-Fluor-UTP wird in die Pilz-RNA eingebaut, wodurch die RNA-Synthese der Pilzzelle gestört wird. Die Wirkung ist fungizid. Um Resistenzen gegen 5-Flucytosin vorzubeugen, muss es mit Amphotericin B oder einem Azol kombiniert werden (26).

Seit einigen Jahren ist eine neue Gruppe von Antimykotika auf dem Markt, die Echinocandine. Der Wirkmechanismus beruht auf die Synthesehemmung von 1,3- β -D-Glucan, einem Bestandteil der Zellwand von *Candida spp.* Bisher sind drei Echinocandine zugelassen: Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin. Studien deuten daraufhin, dass Echinocandine zur Therapie von invasiven Candidosen eine gleiche bis höhere Ansprechrate zeigen als etablierte Antimykotika wie Fluconazol oder Amphotericin B, bei einem besseren

Nebenwirkungsprofil (19,76,83,109). Insgesamt stellen die Echinocandine eine für die Zukunft vielversprechende Alternative zu den bewährten Antimykotika dar.

1.4. Resistenzmechanismen bei *Candida spp.*

Candida spp. mit einer herabgesetzten Sensibilität gegenüber Antimykotika können abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung des Patienten schwerwiegende Folgen haben. Besonders der häufige Einsatz von Azolen zur Prophylaxe und Therapie von *Candida*-Infektionen hat zu einem starken Anstieg von Resistenzen geführt. So konnte z.B. bei HIV-Patienten mit einer fluconazolsensiblen OPC nachgewiesen werden, dass eine mehrmalige Behandlung mit Fluconazol die Entwicklung einer Fluconazol-Resistenz begünstigt (82). *Candida spp.* stehen dabei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um der Wirkung der Antimykotika zu entgehen. Häufig sind dabei mehrere dieser Resistenzmechanismen in einem Patientenisolat zu finden, was für eine multifaktorielle Resistenzentwicklung spricht (69).

1.4.1. Ergosterol-Biosynthese

Im Rahmen einer Azol-Resistenz ist häufig das Enzym Lanosterol 14- α -Demethylase betroffen, welches durch das *ERG11*-Gen kodiert wird. Eine stark erhöhte Expression dieses Gens führt zu einer größeren Enzymmenge, die den inhibierenden Effekt der Azole ausgleichen kann. Dieser Effekt konnte bei verschiedenen *Candida*-Isolaten beobachtet werden (34). Bei einem fluconazolresistenten *C. glabrata*-Stamm konnte sogar die Verdopplung des gesamten Chromosoms, auf welchem das *ERG11*-Gen liegt, nachgewiesen werden. Diese führte zu einem achtfachen Anstieg der mRNA-Menge von *ERG11*. In fluconazolfreiem Medium verloren die Subkulturen das verdoppelte Chromosom, so dass sie wieder fluconazolsensibel wurden (54). Häufiger als die Überexpression sind jedoch Mutationen im *ERG11*-Gen, welche die Affinität der Lanosterol 14- α -Demethylase zu Azolen senken. Bei *C. albicans* sind mittlerweile zahlreiche Punktmutationen bekannt, die nicht zufällig über das gesamte Gen verstreut sind, sondern in drei Regionen des *ERG11*-Gens akkumuliert zu sein scheinen (51,53,86). Möglich ist auch ein alternativer Stoffwechselweg, der die azolgestörte Ergosterol-Biosynthese kompensieren kann. Dieser wird durch einen $\Delta^{5,6}$ -Desaturase-Mangel ausgelöst, dem eine Mutation im *ERG3*-Gen vorausgeht. Normalerweise wird bei der Hemmung der Lanosterol 14- α -Demethylase durch Azole mithilfe der $\Delta^{5,6}$ -

Desaturase aus 14-Methylfecosterol massenhaft 14-Methyl-3,6-diol gebildet, was für den schädigenden Effekt der Azole auf die *Candida*-Zelle verantwortlich zu sein scheint. Findet diese Reaktion infolge eines $\Delta^{5,6}$ -Desaturase-Mangels nicht mehr statt, wird 14-Methylfecosterol als Endprodukt der Ergosterol-Synthese produziert (Abbildung 5). 14-Methylfecosterol kann jedoch im Gegensatz zu 14-Methyl-3,6-diol in die Zellmembran eingebaut werden. Die fungistatische Wirkung der Azole wird dadurch aufgehoben. Im Gegensatz zu *C. albicans* und dem Modellorganismus *S. cerevisiae*, der ein naher, aber apathogener Verwandter von *C. glabrata* ist, scheint dieser Resistenzmechanismus bei *C. glabrata* keine Rolle zu spielen (18,25,39,52).

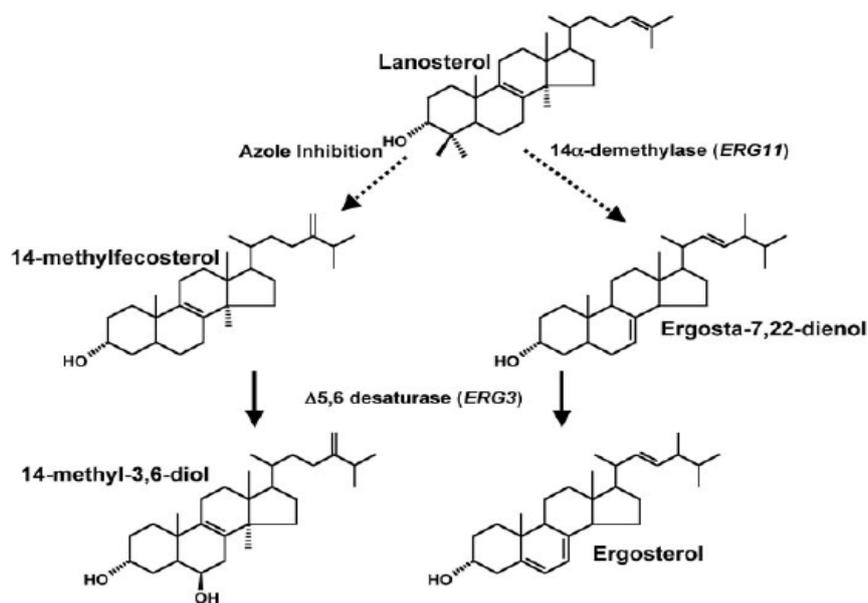


Abbildung 5: Ausschnitt aus der Ergosterol-Biosynthese. Die $\Delta^{5,6}$ -Desaturase, die durch *ERG3* kodiert wird, katalysiert verschiedene Reaktionen in der Ergosterol-Biosynthese (12).

1.4.2. Effluxpumpen

Ein weiterer Resistenzmechanismus, der bei azolresistenten *Candida spp.* nachgewiesen werden konnte, ist der verstärkte Einbau von Transporterproteinen in die Zellmembran, die die intrazelluläre Akkumulation von Azolen verhindern. Azolresistente Isolate zeigen dabei eine erhöhte Expression von Genen, die für *ATP-binding cassette-* (ABC) und *major facilitator-* (MF) Transporter kodieren.

ABC-Transporter sind durch zwei homologe Hälften gekennzeichnet. Jede von ihnen enthält eine N-terminale, intrazelluläre, hydrophile nukleotidbindende Domäne (NBD) und eine C-terminale, hydrophobe Transmembrandomäne (TMD) (74). An der NBD wird ATP

hydrolysiert, wodurch Energie für Konformationsänderungen in den TMD bereitgestellt wird, die für das Ausschleusen des Substrates verantwortlich sind. Die TMD besteht aus sechs Transmembransegmenten (TMS), die verschiedene Bindungsstellen für chemisch unterschiedliche Substrate aufweisen (Abbildung 6). Die Bindung von ATP an die NBD ist dabei keine Voraussetzung für die Substratbindung an den TMS (93).

Eine wichtige Gruppe von Genen, die für ABC-Transporter kodieren, ist die CDR- (*Candida drug resistance*) Genfamilie. Mittlerweile ist eine große Anzahl von CDR-Genen bei *C. albicans* beschrieben worden. Im Rahmen einer Azol-Resistenz sind bei *C. albicans* jedoch nur *CDR1* und *CDR2* relevant (55). Das durch *CDR1* codierte Protein Cdr1p besteht bei *C. albicans* aus 1501 Aminosäuren (73). Die Aminosäuresequenz von Cdr2p stimmt mit der von Cdr1p in 84 % überein (87). Bei *C. glabrata* wird besonders *CDR1*, aber auch *CDR2*, für die dosisabhängige intrinsische Azol-Resistenz verantwortlich gemacht (85). Durch die oben beschriebene Fähigkeit der TMD, verschiedene Substrate zu binden, konnte beispielsweise bei *C. albicans* eine gesteigerte *CDR1*-Expression beobachtet werden, wenn die Zellen in östrogen- oder tetracyclinhaltigen Medien kultiviert wurden (48,57). Ein anderer in dieser Arbeit untersuchter ABC-Transporter ist Snq2p von *C. glabrata*. Dieser ist wichtig für das normale Zellwachstum, indem er zytotoxische Stoffwechselprodukte aus der Zelle transportiert. Snq2p kann eine wichtige Rolle im Rahmen einer Azol-Resistenz spielen. Wie bei Cdr1p und Cdr2p beschrieben, kann auch dieser ABC-Transporter verschiedene Substrate aus der Zelle schleusen. Ein spezifisches Substrat für Snq2p ist 4-Nitroquinolin-1-Oxid (4NQO), das DNA-Läsionen verursacht und tierexperimentell zur Behandlung von Tumoren eingesetzt wird (15).

Die Kontrolle über die Transkription der ABC-Transporter übernimmt ein regulatorisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren. In *S. cerevisiae* wurde dieses sehr gut untersucht. Die Transkriptionsfaktoren weisen hier als Merkmal eine DNA-bindende Zinkfingerdomäne auf. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren in *S. cerevisiae* sind *PDR1* (*pleiotropic drug resistance 1*) und *PDR3*. Diese sind in der Lage, zahlreiche Gene, die für ABC-Transporter kodieren, zu aktivieren (44). Abgeleitet von den Erkenntnissen bei *S. cerevisiae* konnte auch ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls *PDR1* genannt wird, in *C. glabrata* nachgewiesen werden. Dieser ist für die koordinierte Aktivierung von *CDR1* und *CDR2* verantwortlich (107). In einer Studie wurde das *PDR1*-Gen ausgeschaltet, was zu einem Abbruch sowohl der konstitutiven als auch der fluconazolinduzierten Expression von *CDR1* und *CDR2* führte. Das *C. glabrata*-Isolat wurde dadurch hypersensibel gegenüber Fluconazol (106). Bei *C. albicans* werden *CDR1* und *CDR2* über einen Transkriptionsfaktor namens *TAC1* (*transcriptional*

activator of CDR genes 1) gesteuert, der in der Lage ist, Sequenzen in den Promotern von *CDR1* und *CDR2* zu erkennen. Die Ausschaltung des *TAC1*-Gens führt ebenfalls zu einer Hypersensibilität gegenüber Azolen (91). Auch wenn *C. dubliniensis* ein naher Verwandter von *C. albicans* ist, wurde ein entsprechendes Äquivalent zu *TAC1* in *C. dubliniensis* noch nicht gefunden.

MF-Transporter bestehen aus 12 bis 14 TMS, die durch zytoplasmatische Domänen miteinander verbunden sind. Als Energiequelle dient der Protonengradient über der Zellmembran. Das Substrat wird aus der Zelle gepumpt und im Gegenzug gelangen Protonen in die Zelle (Abbildung 6) (111). Innerhalb der Gruppe der MF-Transportergene ist besonders *MDR1* (*multidrug resistance 1*) zu nennen. Eine verstärkte Expression dieses Gens, welches für Mdr1p kodiert, konnte bei azolresistenten *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämmen nachgewiesen werden (61,88). Bei *C. dubliniensis* ist Mdr1p der wichtigste Transporter im Rahmen einer Fluconazol-Resistenz. Cdr1p und Cdr2p sind hier eher von geringerer Bedeutung (60,61). Die Regulation von *MDR1* übernimmt der Transkriptionsfaktor *MRR1* (*multidrug resistance regulator 1*). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen im *MRR1*-Gen, sowohl bei *C. albicans* als auch bei *C. dubliniensis*, zu einer Überexpression von *MDR1* führen können (62,90). Eine Überexpression von MF-Transporter kodierenden Genen kann, analog zu den ABC-Transportern, durch verschiedene Substrate verursacht werden. So wurde in einer Studie nachgewiesen, dass Rifampicin bei *C. albicans* zu einer verstärkten Expression von *MDR1* führt (108). Diese Fähigkeit der MF- und ABC-Transporter, verschiedene, chemisch nicht verwandte Substrate binden zu können, ist für die bei *Candida spp.* beobachtete *multidrug resistance* verantwortlich. Sie entsteht durch die Überexpression von Genen, die für MF- oder ABC-Transporter kodieren. *Candida*-Zellen werden dadurch resistent gegenüber einer großen Anzahl verschiedenster Stoffe, auch wenn sie zuvor keinen Kontakt mit diesen Stoffen hatten.

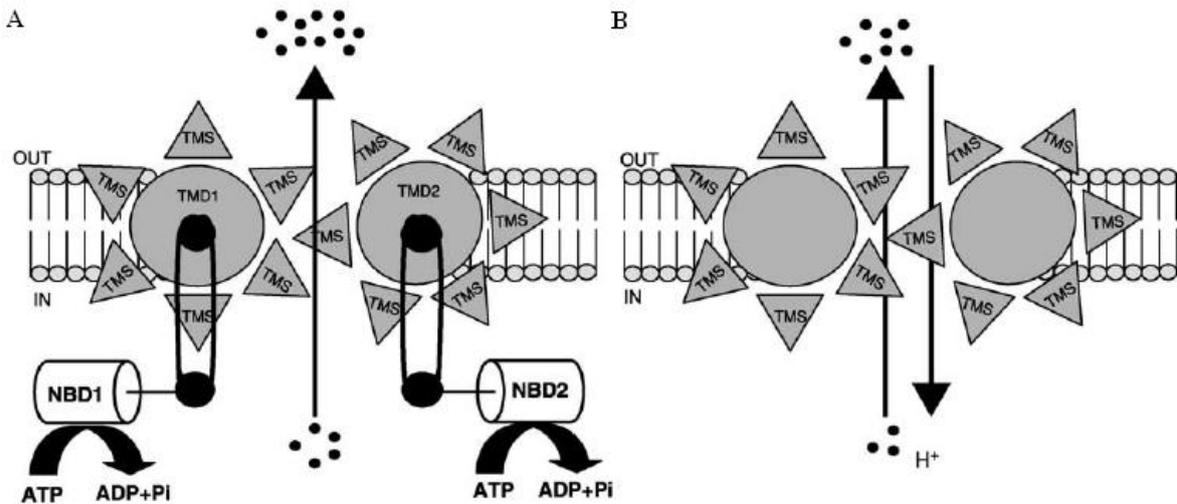


Abbildung 6: ABC- und MF-Transporter in *Candida spp.* (A) Schematische Darstellung eines ABC-Transporters, welcher aus zwei im Aufbau identischen Hälften besteht. Jede dieser Hälften besteht aus einer hydrophilen NBD und einer hydrophoben TMD, die aus jeweils sechs TMS besteht. ABC-Transporter hydrolisieren ATP zu ADP + P, um einen Stoff aus der Zelle zu transportieren. (B) Schematische Darstellung eines MF-Transporters, bestehend 12-14 TMS. Der Transport erfolgt mittels des Protonengradienten über der Zellmembran (74,111).

Der Mechanismus der Resistenzentwicklung durch Effluxpumpen wurde durch eine erhöhte intrazelluläre mRNA-Konzentration der entsprechenden Gene nachgewiesen. Die erhöhte Konzentration von mRNA kann drei Ursachen haben. Zunächst ist es möglich, dass mehrere Kopien des Gens, z.B. durch eine Verdopplung des Chromosoms, vorliegen, während die Transkription desselben Gens normal bleibt. Des Weiteren kann nur die Transkription des Gens erhöht sein. Auch hier ist die mRNA-Menge gesteigert. Als letzte mögliche Ursache einer erhöhten mRNA-Konzentration kann die Halbwertszeit der mRNA verlängert bzw. die Degradation der RNA verlangsamt sein. Welcher dieser drei Mechanismen hier die wichtigste Rolle spielt, ist nicht abschließend geklärt (111).

1.4.3. Andere Resistenzmechanismen

Eine Azol-Resistenz kann auch bei sogenannten *petite mutants* beobachtet werden. Hier kommt es infolge von einzelnen Mutationen oder eines kompletten Verlustes der mitochondrialen DNA zu einer Störung der Zellatmung. In *C. glabrata petite mutants* konnte eine Überexpression der ABC-Transportergene *CDR1* und *CDR2* nachgewiesen werden (7). *C. albicans* und *C. dubliniensis* zählen zu den *petite-negative* Hefen, obwohl auch *C. albicans* unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, *petite mutants* zu bilden (1). Die Lipidzusammensetzung der *Candida*-Membran scheint ebenfalls wichtig im Rahmen einer Azol-Resistenz zu sein. So konnte bei fluconazolresistenten Isolaten von *C. albicans* ein

veränderter Sterol- und Phospholipidgehalt nachgewiesen werden (43). Ein Absinken des Sterol- oder Sphingolipidgehaltes führte dagegen zu einer Hypersensibilität gegenüber Azolen. Auch die Funktion von ABC-Transportern wird durch den Gehalt und die Interaktion von Sphingolipiden und Sterol beeinflusst (63). Weitere Resistenzmechanismen sind bei *Candida spp.* bekannt. Sie werden hier aber nicht weiter erörtert.

1.5. *Candida spp.* in der Hämatologie/Onkologie

Infektionen durch *Candida spp.* stellen bei hämatologisch-onkologischen Systemerkrankungen eine schwerwiegende Komplikation dar. So wird die Inzidenz von invasiven Candidosen bei Stammzelltransplantationen oder akuten Leukämien zwischen 8 % und 30 % angegeben (112). Der wichtigste Grund für die hohe Inzidenz von *Candida*-Infektionen in der Hämatologie/Onkologie liegt neben den unter 1.2.2 genannten Risikofaktoren an der Granulozytopenie. Diese kann primär durch hämatologische Erkrankungen hervorgerufen werden, z.B. bei akuten oder chronischen Leukämien, bei einem MDS, einer Agranulozytose oder einem multiplen Myelom. Sekundär kann eine Granulozytopenie durch Knochenmarksinfiltrationen anderer Tumorarten, Virusinfektionen (z.B. Parvovirus-B-19), Noxen (z.B. Metamizol), Mangelernährung (z.B. Mangel an Folsäure) oder als Resultat einer Strahlen- oder Chemotherapie entstehen. Die Granulozytopenie ist abhängig von ihrer Dauer mit einem hohen Infektionsrisiko behaftet. Die Arbeitsgemeinschaft Infektionen in der Hämatologie und Onkologie (AGIHO) der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) teilt das Infektionsrisiko in ein niedriges (\leq fünf Tage), mittleres (sechs bis neun Tage) und hohes (\geq 10 Tage) ein. Bei dem Auftreten von antibiotikaresistentem Fieber, welches länger als fünf Tage andauert, sind u.a. *Candida*-Infektionen bedeutsam. Die weiterführende Diagnostik muss unter diesem Gesichtspunkt ausgerichtet werden, wobei der Erregernachweis bei invasiven Mykosen große Schwierigkeiten bereiten kann.

1.6. Doxorubicin und die Wirkung auf humane und fungale Zellen

1.6.1. Einsatzgebiet und Wirkmechanismus von Doxorubicin

Das in dieser Arbeit verwendete Doxorubicin, auch Adriamycin genannt, gehört zur Stoffgruppe der Anthracycline. Es ist ein häufig verwendetes Chemotherapeutikum mit einem breiten Wirkspektrum, weshalb es neben dem Einsatz in der Hämatologie/Onkologie auch in anderen medizinischen Fachbereichen vielfältige Verwendungen bei der Behandlung von malignen Erkrankungen findet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinischer Einsatz von Doxorubicin (78).

Kurativer Einsatz	Palliativer Einsatz
Akute lymphatische Leukämie	Rezidiv einer akuten Leukämie
Akute myeloische Leukämie	Chronische lymphatische Leukämie
Ausgewählte Non-Hodgkin Lymphome	Ausgewählte Non-Hodgkin Lymphome
Hodgkin Lymphom	Multipl. Myelom
Brustkrebs (adjuvant)	Rezidiv/Metastasen eines Weichteil-/Osteosarkoms
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Mesotheliom
Osteosarkom (adjuvant)	Inselzelltumore/Karzinoide
Weichteilsarkom (adjuvant)	Tumore der Blase, Brust, Kopf, Hals, Leber, Lunge, Eierstöcke, Bauchspeicheldrüse, Prostata, Magen, Schilddrüse, Hoden, Gebärmutter
Keimzelltumore der Eierstöcke und Hoden	

Die antiproliferative und antineoplastische Wirkung von Doxorubicin beruht auf verschiedenen Mechanismen, die v.a. in humanen Krebszellen und in Zellen des Modellorganismus *S. cerevisiae* untersucht wurden. In humanen Krebszellen konnte gezeigt werden, dass infolge der NADPH-abhängigen Carbonyl-Reduktion, im Rahmen des enzymatischen Abbaus von Doxorubicin, Doxorubicinol entsteht (Abbildung 7). Dieses zeigt zwar eine schwächere antiproliferative Wirkung als Doxorubicin, ist jedoch polarer und verbleibt somit länger intrazellulär (16).

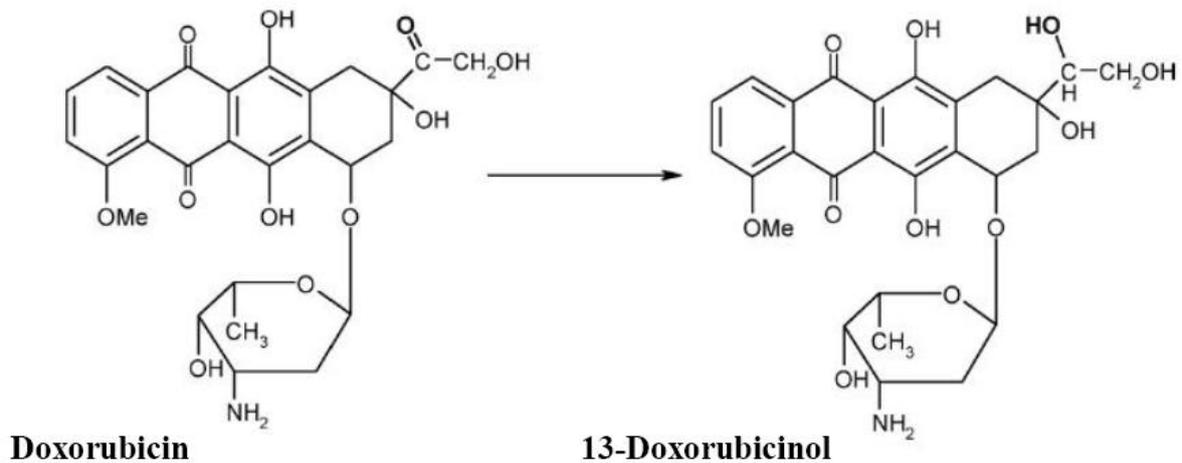


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Carbonyl-Reduktion von Doxorubicin (24).

Zudem kann Doxorubicin, katalysiert durch die mitochondriale NADP-Dehydrogenase und in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, Superoxid-Radikale bilden. In einem weiteren Schritt können Hydroxyl-Radikale entstehen, welche die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran schädigen (Abbildung 8) (58). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass ein Absinken der intrazellulären Konzentration an Glutathion, welches ein wichtiges Antioxidans ist, zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Doxorubicin infolge der gesteigerten Membranschädigung durch Sauerstoffradikale führt (9). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression der Mangan-Superoxid-Dismutase, ein wichtiges Enzym zum Abbau von Superoxid-Radikalen, in *S. cerevisiae* eine protektive Wirkung gegenüber Doxorubicin (46). Des Weiteren ist Doxorubicin in der Lage, in die DNA zu interkalieren. Die resultierende Veränderung der räumlichen DNA-Struktur stört die Funktion der Topoisomerase IIA, welche ein Schlüsselenzym in der Zellteilung darstellt (72,75).

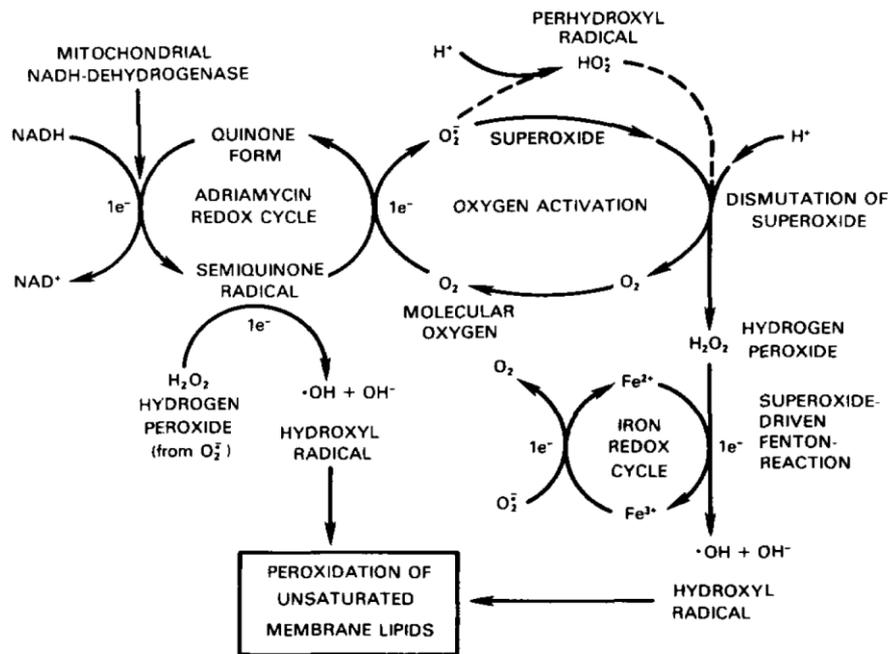


Abbildung 8: Dargestellt ist die Lipid-Peroxidation durch Doxorubicin. Mithilfe des NADH-Dehydrogenase-abhängigen Redoxzyklus von Doxorubicin kann ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die entstehenden Superoxidationen-Radikale können sekundär zu Hydroxyl-Radikalen reagieren, welche ungesättigte Fettsäuren in der Membran schädigen können (58).

1.6.2. Die Wirkung von Doxorubicin auf humane ABC-Transporter

Beim Menschen sind bislang 48 Gene bekannt, die für ABC-Transporter kodieren. Diese werden anhand der Aminosäuresequenz und der Domänenstruktur in sieben Gruppen (ABCA-ABCG) eingeteilt. Zu den ABC-Transportern gehören auch Kanäle, wie der CFTR- (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) Kanal, der auch ABCC7 genannt wird (94). Humane ABC-Transporter können abhängig von der Gruppe verschiedenartig aufgebaut sein (Abbildung 9). Einer der am besten untersuchte ABC-Transporter ist P-Glykoprotein (P-Gp = ABCB1), das Produkt des humanen *MDR1*- (*multiple drug resistance 1*) Gens. Er besteht aus zwei TMD, die jeweils sechs TMS enthalten, sowie zwei NBD, die sich am N-terminalen Ende der TMD befinden. Der ABC-Transporter *CDR1* in *Candida spp.* ist demnach spiegelverkehrt zu dem humanen P-Gp aufgebaut, was die nahe Verwandtschaft der humanen und fungalen ABC-Transporter aufzeigt (73). Die Bindung eines Substratmoleküls an das TMS stimuliert die Hydrolyse eines ATP an der NBD. Durch die daraus resultierende Konformationsänderung der TMD wird das Substratmolekül aus der Zelle geschleust. Die Hydrolyse eines zweiten ATP-Moleküls an der NBD bewirkt eine Konformationsänderung in den TMD, die die Ausgangssituation wieder herstellt, so dass ein weiteres Substratmolekül gebunden werden kann (30). Die Deaktivierung einer NBD blockiert den Transport des

Substratmoleküls über die Membran und verhindert die Hydrolyse von ATP an der anderen NBD. Zwischen den NBD existiert demnach eine enge Kommunikation (4). ABC-Transporter erfüllen im Menschen verschiedene Aufgaben. Sie sind beispielsweise am Export von toxischen oder von der Leber detoxifizierten Stoffen beteiligt. Das sekretorische Epithel nutzt die ABC-Transporter zum Export von Gallensalzen, Phosphatidylcholin oder Bilirubin-glucuronid. Im GIT wird durch die ABC-Transporter verhindert, dass giftige Nahrungsbestandteile aufgenommen werden. Zudem werden vitale Strukturen, wie die Blut-Hirn-Schranke, die Plazenta oder das Knochenmark, durch ABC-Transporter vor im Blut befindlichen toxischen Stoffen geschützt (4). Neben ihrer wichtigen physiologischen Funktion sind ABC-Transporter aber auch an der Entstehung einer *multidrug resistance* bei humanen Tumoren beteiligt. Ähnlich den ABC-Transportern von *Candida spp.* können humane ABC-Transporter verschiedene, chemisch nicht verwandte Substrate binden. Die Entwicklung einer Resistenz gegen das eingesetzte Chemotherapeutikum führt dadurch zu einer Resistenzentwicklung gegen andere in der Behandlung zuvor nicht eingesetzte Chemotherapeutika. Die Entwicklung einer *multidrug resistance* ist ein häufiger Grund für das Versagen einer chemotherapeutischen Behandlung. Im Rahmen einer Resistenzentwicklung sind v. a. die Transporter P-Gp, MRP1 (*multidrug resistance protein 1* = ABCC1) und ABCG2 wichtig (94). Substrate von P-Gp, die in der chemotherapeutischen Behandlung Verwendung finden, sind Doxorubicin, Daunorubicin, Vincristin, Vinblastin und Etoposid. MRP1 transportiert u.a. Doxorubicin, Epirubicin, Vincristin, Etoposid und Methotrexat. Substrate von ABCG2 sind Doxorubicin, Daunorubicin, Mitoxantron und Topotecan (30). Eine Langzeitbehandlung mit Doxorubicin kann eine Überexpression der oben genannten Gene verursachen. Die so entstandene Resistenz hat zur Folge, dass auch andere Chemotherapeutika unwirksam werden, was für den Patienten abhängig von der Tumorart fatale Folgen haben kann (11).

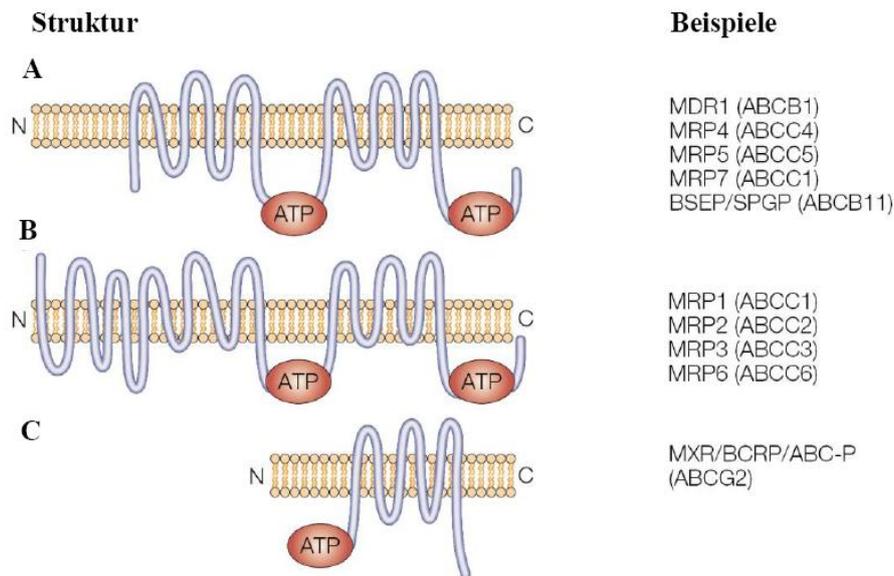


Abbildung 9: Struktur verschiedener ABC-Transporter, die in der Resistenzentwicklung involviert sind. A) ABC-Transporter, wie *MDR1* bestehen aus zwei TMD mit jeweils sechs TMS und zwei NBD. B) *MRP1*, 2, 3, und 6 bestehen ebenfalls aus zwei NBD. Am N-terminalen Ende befindet sich eine zusätzliche Domäne mit fünf TMS, so dass insgesamt 17 TMS vorhanden sind. C) *ABCG2* besteht nur aus einer TMD und einer NBD, die sich am N-terminalen Ende der TMD befindet (30).

1.6.3. Die Wirkung von Doxorubicin auf Resistenzmechanismen in *Candida spp.*

Bisher wurden nur wenige Studien über die Auswirkung von Doxorubicin auf Resistenzmechanismen bei *Candida spp.* durchgeführt. Die existierenden Studien konzentrieren sich auf die ABC-Transporter von *Candida spp.*, die wie in 1.6.2 erwähnt eng verwandt mit den humanen ABC-Transportern sind. So konnte beobachtet werden, dass Doxorubicin bei *C. albicans* eine Überexpression von *CDR1*, einem nahen Verwandten des humanen P-Gp, und *CDR2* auslösen kann. Cyclophosphamid, das kein Substrat des humanen P-Gp ist, konnte hingegen keine erhöhte Expression von ABC-Transportern in *C. albicans* verursachen (42). In einer anderen Studie, in der Doxorubicin zu einem kurzfristigen Anstieg der Amphotericin B-Toleranz von *C. albicans* führte, konnte dieser Zusammenhang ebenfalls gezeigt werden (67). Zudem wurde vermutet, dass Doxorubicin *petite mutants* von *S. cerevisiae* selektiert, bei denen durch den Mangel der Cytochrom-Oxidase IV der Elektronentransport über der mitochondrialen Membran gestört ist. Dadurch sind nicht genügend Elektronen vorhanden, um den Redoxzyklus von Doxorubicin und damit das Entstehen von Sauerstoffradikalen zu gewährleisten (Abbildung 8). Die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin wird so abgeschwächt (9). Bei *C. utilis* konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin-Konzentrationen bis 200 µg/ml apoptotisch wirken. Höhere Konzentrationen haben einen nekrotischen Zerfall der *Candida*-Zelle zur Folge (40).

1.7. Zielstellung

Im Rahmen ihrer Grunderkrankung sind Patienten in der Hämatologie/Onkologie in besonderem Maße gefährdet, eine Infektion mit *Candida spp.* zu entwickeln. Ein Versagen der antimykotischen Therapie kann in diesem Patientenkreis fatale Folgen haben. Aus diesem Grund ist es wichtig, mögliche Wechselwirkungen von Chemotherapeutika wie Doxorubicin auf das Resistenzverhalten von *Candida spp.* zu untersuchen. Bei *C. albicans* konnte bereits gezeigt werden, dass Doxorubicin einen Einfluss auf die Aktivierung von Resistenzgenen und auf die Fluconazol-Toleranz hat (42).

In dieser Arbeit sollen die beiden *Candida spp.*, *C. dubliniensis* und *C. glabrata* hinsichtlich dieser bei *C. albicans* gezeigten Wechselwirkungen untersucht werden. *C. dubliniensis* ist ein naher Verwandter von *C. albicans* (102). *C. glabrata* ist eine der wichtigsten Nicht-*C. albicans spp.* (50). Ziel ist es, zu untersuchen, ob und in welchem zeitlichen Zusammenhang Doxorubicin bei diesen *Candida spp.* in der Lage ist, Resistenzgene zu aktivieren. Zudem soll untersucht werden, ob eine durch Doxorubicin induzierte Aktivierung von Resistenzgenen abhängig von dem verwendeten Medium ist. Hierfür werden verschiedene Stämme von *C. dubliniensis* und *C. glabrata* in unterschiedlichen doxorubicinhaltigen sowie doxorubicinfreien Minimal- und Maximalmedien über 90 Minuten und 10 Tage kultiviert. In regelmäßigen Abständen wird die Expression der Resistenzgene *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* bei *C. dubliniensis* und *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* bei *C. glabrata* gemessen. In einem weiteren Schritt soll untersucht werden, ob und in welchen Konzentrationen Doxorubicin bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata* einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol hat. Dazu wird zum einen die minimale Hemmstoffkonzentration für Fluconazol (MHK_{Flu}) während der 10-Tage Versuche in regelmäßigen Abständen gemessen. Zum anderen wird, unabhängig von den Versuchen über 10 Tage, das Wachstum der verschiedenen Stämme von *C. dubliniensis* und *C. glabrata* in einem Medium untersucht, das sowohl Doxorubicin als auch Fluconazol in unterschiedlichen Konzentrationen enthält.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mikroorganismen

Alle DSM-Stämme stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig. Die RKI-Stämme kamen aus dem Robert-Koch Institut, Berlin. Der *C. glabrata*-Stamm H. D. war ein Patientenisolat der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie der Charité Berlin.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten *Candida*-Stämme mit den entsprechenden MHK_{Flu} bei vorheriger Anzucht in YPD.

Spezies	Bezeichnung	Abkürzung	MHK_{Flu}
<i>C. dubliniensis</i>	DSM 13268		0,25
	RKI 01-0170-01	Cd1	0,25
	RKI 01-0265	Cd2	0,25
	RKI 01-0268-02	Cd3	0,25
<i>C. glabrata</i>	DSM 11950		4
	RKI 06-0367	Cg1	8
	RKI 05-0559-02	Cg2	4
	RKI 05-0445-01	Cg3	32
	H. D.	Cg4	32

2.1.2. Reagenzien und Lösungen

2.1.2.1. Kultivierung

YPD-Flüssigmedium	Qbiogene, Heidelberg
YNB-Flüssigmedium	Qbiogene, Heidelberg
RPMI 1640 + GlutaMax TM	Invitrogen, Karlsruhe
+ fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
(10 % Endkonzentration)	
BBL TM Sabouraud Dextrose Agar	Becton & Dickinson Co, Heidelberg
CHROM TM Agar Candida	CHROMagar, Paris
Doxorubicin (200 µg/ml)	Apotheke Charité, Berlin
Glycerin	Merck, Darmstadt
1 × PBS	PAA KGaA, Pasching

2.1.2.2. RNA-Extraktion

RNApro TM -Lösung	Qbiogene, Heidelberg
Lysematrixgefäße No. D	Qbiogene, Heidelberg
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (99,9 %)	Merck KGaA, Darmstadt
DEPC-behandeltes Wasser	Qbiogene, Heidelberg

2.1.2.3. cDNA-Synthese

PCR-Wasser (Aqua ad iniectabilia)	Braun AG, Melsungen
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
5x First Strand-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe

dNTP (10 mM)	Applied Biosystems, Darmstadt
DNase I, RNase-free (10 U/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNasin®Plus RNase Inhibitor (40 U/μl)	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase Superscript III (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2.4. RT-PCR

10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl ₂ (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP (10 mM)	Applied Biosystems, Darmstadt
Platinum Taq-Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
96-Well Mikrotiterplatten für LC480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Abschlussfolie für 96-Well	

2.1.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose, DNA Typing Grade™	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
10x TBE-Puffer	Serva, Heidelberg
6x Gelladepuffer	PeqLab, Erlangen
DNA-Marker VI (154-2176 bp)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.2.6. *MHK_{Flu}*-Bestimmung und Chequerboard-Test

MOPS (34,35 g/l)	Sigma, Steinheim
Glucose (18 g/l)	Merck, Darmstadt
NaCl-Lösung (0,9 %)	Merck, Darmstadt
Fluconazol	Pfizer, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium (10,4 g/l)	Sigma, Steinheim

2.1.3. Primer*C. dubliniensis*

<i>ACT1-S</i>	5'CTg gTg ATg gTg TTA CTC ACg TT ^{3'}
<i>ACT1-A</i>	5'CTC TAC CAg CCA AAT CAA TTC TCA A ^{3'}
<i>CDR1-F</i>	5'ggA AAT TAg CCA CAg AAg gTC TTA g ^{3'}
<i>CDR1-A</i>	5'gTg gAA ACC ATA TgT gTT TAC AgC AA ^{3'}
<i>CDR2-F</i>	5'Tgg ACA ATA TAT TCC TAg Tgg ACC T ^{3'}
<i>CDR2-A</i>	5'AAT ACA gCA AAT gCA ACC gT ^{3'}
<i>MDR1-F</i>	5'ggA ATT TAC CAg TTg gAT TAg CTg C ^{3'}
<i>MDR1-A</i>	5'CAT AAC AAA TgA AAA CCC AgA AAT AA ^{3'}
<i>ERG3-S</i>	5'ATC TTg Tgg CAA ATT CCT AAA TTC AT ^{3'}
<i>ERG3-R</i>	5'gAA AgC ATg AgA AgC AAA Tgg AgT ^{3'}
<i>ERG11-S</i>	5'CCC CAT TAg TgT TTT ATT gga TTC CT ^{3'}
<i>ERG11-R</i>	5'gAC CTT TTg gAC CTA AAT AAA CCg ^{3'}

C. glabrata

<i>ACT1-S</i>	5'gAg CCg TCT TCC CTT CCA TC ^{3'}
<i>ACT1-A</i>	5'TCg TCA CCg ACg TAA gAg TCC T ^{3'}
<i>CDR1-F</i>	5'AgC AAC TCA gAC CCg gAT TAC TAC ^{3'}
<i>CDR1-A</i>	5'ggT ATT CgA TAT CAg CAg ATT CAC C ^{3'}
<i>CDR2-F</i>	5'CCC TgA CTT CTT gAC TTC gAT C ^{3'}
<i>CDR2-R</i>	5'TTC TCT TAg TTg CTT ATA TTC CTC g ^{3'}
<i>SNQ2-S</i>	5'CAA TCT gTC TTT TgA gCA CAg ACC TA ^{3'}
<i>SNQ2-A</i>	5'CAg TTC TgT TCA gAC CAg ACA gg ^{3'}

<i>PDR1-F</i>	5'CAg AgT gCC AAA gTA TgC AgC ^{3'}
<i>PDR1-A</i>	5'CAA gAA TTT TTT TgA ATg ACA ACg TA ^{3'}

Alle Primer wurden von der Firma TIB[®] MOLBIOL aus Berlin hergestellt.

2.1.4. Sonden

C. dubliniensis

<i>ACT1</i>	5'6FAM-TCC AAT TTA CgC Tgg TTT CTC CTT ACC--BBQ ^{3'}
<i>CDR1</i>	5'6FAM-TCg AAC AAC CAg CAC CAg gTC TAC CC--BBQ ^{3'}
<i>CDR2</i>	5'6FAM-ATC CCA AAg TTT CTC CAT TTg TgT gAA g--BBQ ^{3'}
<i>MDR1</i>	5'6FAM-ACA CAT gAA CCA AAA AgT CCA TCT CCA AC--BBQ ^{3'}
<i>ERG3</i>	5'6FAM-TTC ACT gAT TgC ggT ATT TAT TTC CTC CAT--BBQ ^{3'}
<i>ERG11</i>	5'6FAM-TgC TgC TTC TTT Tgg TCA AAA ACC TTA TgA--BBQ ^{3'}

C. glabrata

<i>ACT1</i>	5'6FAM-CAT ACC gAC CAT gAT ACC TTg gTg TCT Tg--BBQ ^{3'}
<i>CDR1</i>	5'6FAM-TTg CgA CCA AAT CCT TCC AgT AAC AgC C--BBQ ^{3'}
<i>CDR2</i>	5'6FAM-CAT ATC CAA Tgg CgT CTg Tgg CA--BBQ ^{3'}
<i>SNQ2</i>	5'6FAM-CTg AAg CAT Tgg gAA gTA CTA TCg CCA A--BBQ ^{3'}
<i>PDR1</i>	5'6FAM-AgC ATC ggA ggT AgA TCT gCA Agg TCA--BBQ ^{3'}

Alle Sonden wurden von der Firma TIB[®] MOLBIOL aus Berlin hergestellt.

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
sterile Einmalpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon, Heidelberg
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Heidelberg
Plastikösen	Nalge Nunc International, Wiesbaden

2.1.6. Geräte

Schüttelinkubator Aerotron	Infors AG, Bottmingen
Brutschrank Function line	Heraeus, Hanau
VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries, New York
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
LightCycler® LC 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fastprep™ FP 120	MP Biomedicals, Solon
Clene Cab	Herolab, Wiesloch
Photometer 1101M	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophorese- Kammer Horizon™	Life Technologies, Gaithersburg
Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Labofuge ^{GL}	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Heidolph MR 200, Schwabach
LaminAir HBB 2448	Heraeus, Hanau

Präzisionswaage MC1	Sartorius, Göttingen
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Geldokumentationssystem	Decon Science Tec, Hohengandern

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung

Die bei -80°C eingefrorenen *Candida*-Isolate wurden aufgetaut, auf Sabouraud-Agar ausplattiert und über Nacht bei 35°C im Brutschrank inkubiert. Bei einem ausreichenden Wachstum der Kolonien wurden jeweils 10 ml YPD-Flüssigmedium in 50 ml Falcon-Röhrchen beimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben mit Doxorubicin behandelt. Ziel war es, eine Doxorubicin-Konzentration von $20\ \mu\text{g/ml}$ zu erreichen. Dazu wurden die Kulturen vom Vortag zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 3,5 ml YPD-Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension wurde in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen mit 8 ml YPD und 1 ml Doxorubicin ($200\ \mu\text{g/ml}$) bzw. 9 ml YPD in der unbehandelten Kontrolle überführt und über Nacht im Schüttler bei $30\ ^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Versuche wurden über 10 Tage durchgeführt. Um den möglichen Einfluss von Stoffwechselmetaboliten der Kulturen auf die Genexpression zu verringern und die Wirkung des Doxorubicins zu gewährleisten, wurde ein Mediumwechsel am 1., 2., 3., 6. und 8. Tag durchgeführt. Die Entnahme der Proben für die RNA-Extraktion erfolgte an den gleichen Tagen sowie zu Beginn des Versuches (Tag 0) und zum Ende (Tag 10). Dazu wurden die Zellsuspensionen bei $900 \times g$ über 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml YPD-Flüssigmedium resuspendiert. Davon wurden jeweils 1,5 ml zur Bestimmung der MHK_{Flu} und zur RNA-Extraktion in einem 2 ml Reaktionsgefäß abgenommen. 1 ml der Suspension verblieb im 50 ml Falcon-Röhrchen. Um die Wirkstoffkonzentration wieder zu erreichen, wurden 8 ml YPD-Flüssigmedium und 1 ml Doxorubicin ($200\ \mu\text{g/ml}$) zugegeben, bzw. 9 ml YPD-Flüssigmedium bei den unbehandelten Kontrollen. Die Proben für die MHK_{Flu} -Bestimmung und für die RNA-Extraktion wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschriff mit $1 \times \text{PBS}$. Danach wurden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die MHK_{Flu} -Bestimmung wurde das Pellet in 40 %iges Glycerin resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Das Pellet für die RNA-Extraktion wurde bei -80°C eingefroren. Um mögliche

Kontaminationen durch andere Mikroorganismen ausschließen zu können, wurden die Proben des 10-Tage Versuchs am 1., 6. und 10. Tag auf Sabouraud Dextrose Agar und Chromagar ausgestrichen. Die 10-Tage Versuche in YNB und RPMI + iFKS wurden nach der gleichen Abfolge durchgeführt. Es wurden zudem Versuche über einen Kultivierungszeitraum von 90 min durchgeführt. Hier wurde ebenfalls nach dem oben beschriebenen Schema vorgegangen. Jedoch wurde das Zellpellet, das nach der 90-minütigen Kultivierung gewonnen wurde, vollständig zur Gewinnung der RNA verwendet. Alle Versuche über 10 Tage bzw. 90 min wurden zweimal unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2. RNA-Extraktion

Die bei -80°C eingefrorenen Pellets wurden aufgetaut und in 1 ml RNAProTM-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde dann in ein Lysing-Matrix-D-Reaktionsgefäß überführt, in dem die Zellen durch die im Reaktionsgefäß enthaltenen Glaskügelchen in 40 s bei 6 m/s im FastPrep-Cell-Disrupter aufgeschlossen wurden. Die Proben wurden dann kurz auf Eis abgekühlt und der Schritt wiederholt. Die Lysing-Matrix-C-Reaktionsgefäße wurden anschließend 5 min bei $13000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, so dass sich die Zelltrümmer am Boden absetzten. Der Überstand wurde abgenommen und im nächsten Schritt mit 300 μl Chloroform versetzt und sofort 10 s geschüttelt. Die Probe wurde dann 20 min auf Eis inkubiert und erneut 15 min bei $13000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Vom entstandenen Zweiphasengemisch wurde die obere Phase mit der RNA abgenommen, mit dem gleichen Volumen kaltem 100 %igen Ethanol vermischt und über Nacht bei -20°C gelagert, so dass die RNA ausfällen konnte. Am folgenden Tag wurde das Gemisch 15 min bei $13000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, so dass sich die RNA am Boden des Reaktionsgefäßes ablagerte. Der Überstand wurde verworfen und das weißliche Pellet mit 75 %igen Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet je nach Größe in 20-100 μl DEPC-behandeltem Wasser vorsichtig resuspendiert. Um das Lösen der RNA im DEPC-behandeltem Wasser zu unterstützen, wurden die Proben kurz auf 60°C erhitzt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch gemessen. 2 μl der RNA-Probe wurden im Verhältnis 1:50 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Leerwert galt eine Probe mit DEPC-behandeltem Wasser. Simultan erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm, die proportional zum Protein-Gehalt der Probe ist. Der Quotient beider Wellenlängen (260 nm / 280 nm) gibt das Verhältnis zwischen RNA-Gehalt und Proteingehalt wieder. Ist

die RNA qualitativ hochwertig, der Proteingehalt also möglichst gering, sollte der Quotient zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.3. cDNA-Synthese mit DNase-Verdau

Aufgrund der größeren Thermostabilität war es für die RT-PCR notwendig, die extrahierte RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Die bei -80°C gelagerte RNA wurde aufgetaut und auf Eis gelagert. Da zur Weiterverarbeitung eine RNA-Menge von $1\ \mu\text{g}$ gelöst in $1\ \mu\text{l}$ DEPC-behandeltem Wassers benötigt wurde, mussten einige Proben anhand der zuvor ermittelten RNA-Konzentration mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt werden. Die RNA-Probe, die nun eine RNA-Konzentration von $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufwies, wurde mit $18\ \mu\text{l}$ PCR-Wasser und $1\ \mu\text{l}$ Oligo(dT)₁₂₋₁₈Primer in ein $0,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und $10\ \text{min}$ bei 75°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen und das erste Anlagern der Primer am poly-A Ende der mRNA zu ermöglichen. Im folgenden Schritt wurde in jede Probe $17,5\ \mu\text{l}$ des Mastermixes pipettiert, der $8\ \mu\text{l}$ First-Strand-Buffer, $4\ \mu\text{l}$ DTT, $4\ \mu\text{l}$ dNTPs, $0,5\ \mu\text{l}$ RNasin[®] Plus RNase Inhibitor und $1\ \mu\text{l}$ DNase enthielt. Der RNase Inhibitor verhindert die Degradierung der RNA durch ubiquitär vorkommende Rnasen, die DNase baut die eventuell noch vorhandene DNA ab, die bei der folgenden RT-PCR stören würde und DTT schützt die Sulfhydrylgruppen und stabilisiert damit die Enzyme. War die Probe leicht gemischt und anzentrifugiert, wurde sie im Trio-Thermoblock $30\ \text{min}$ bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Bindung der Oligo(dT)₁₂₋₁₈Primer an den poly-A Enden der mRNA und dem DNA-Abbau durch die DNase. Das folgende 5-minütige Erhitzen der Proben auf 75°C stellte die vollständige Denaturierung der RNA sowie die Inaktivierung der DNase sicher. Anschließend wurden in die Probe $1\ \mu\text{l}$ Reverse Transkriptase und $1\ \mu\text{l}$ RNasin[®] Plus RNase Inhibitor gegeben und die Probe $60\ \text{min}$ bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit schrieb die Reverse Transkriptase die mRNA zu cDNA um. Zur Inaktivierung aller noch vorhandenen Enzyme folgte eine 5-minütige Inkubation bei 94°C . Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4. RT-PCR

Wie bei der herkömmlichen PCR wird die Matrize bei der RT-PCR in jedem Zyklus nahezu verdoppelt. Ein Zyklus beinhaltet die Phasen Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Zunächst ist es erforderlich, die Polymerase einmalig $3\ \text{min}$ bei 95°C zu

aktivieren. An der im 1. Zyklus einsträngig vorliegenden cDNA werden in der Anlagerungsphase die für das Gen spezifischen Primer angelagert. Dies geschieht bei einer Temperatur, die abhängig von der Primersequenz ist. Sie sollte 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen. Die Elongation erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Hier wird der zur cDNA-Matrize komplementäre Strang synthetisiert, so dass die DNA doppelsträngig vorliegt. Die Primer bilden dabei den Start- bzw. Endpunkt. In der sich anschließenden Denaturierung, die den Beginn des 2. Zyklus markiert, werden die DNA-Doppelstränge wieder aufgetrennt. Die Temperaturen sowie die Dauer der einzelnen PCR-Schritte sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Zyklen wurden insgesamt 45 Mal wiederholt.

In der RT-PCR kann nun die Menge des PCR-Produktes in jedem Zyklus erfasst werden. Dies geschieht durch eine sequenzspezifische Sonde. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Reporterfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende der BlackBerry™ Quencher (BBQ). Wenn die Sonde durch eine spezifische Wellenlänge von 483 nm angeregt wird, absorbiert der Quencher aufgrund der räumlichen Nähe zum Reporterfarbstoff dessen Fluoreszenz, durch einen Fluoreszenz-Energietransfer. Während der Elongationsphase baut die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase die Sonde ab, wodurch der Reporterfarbstoff räumlich vom Quencher getrennt und der Fluoreszenz-Energietransfer unterbrochen wird (Abbildung 10). Die Emission des Reporterfarbstoffes kann nun bei einer Wellenlänge von 533 nm gemessen werden. Jeder neu gebildete DNA-Strang wird demnach durch ein Fluoreszenzsignal detektiert. Die nicht gebundenen Sonden werden nicht erfasst.

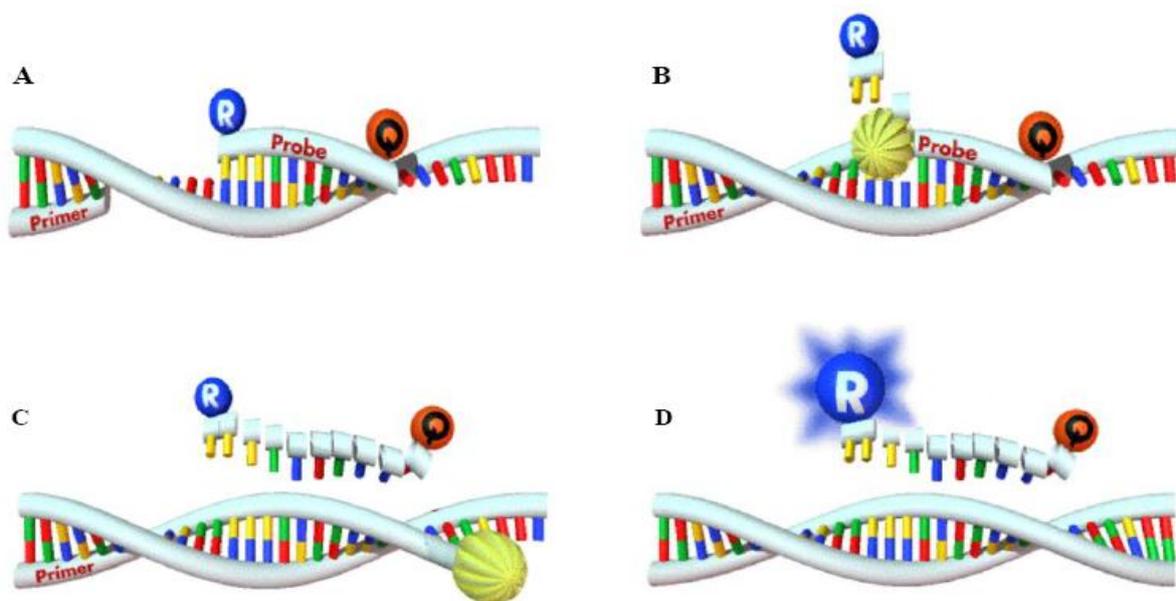


Abbildung 10: Schema zur Entstehung des Fluoreszenzsignals während der RT-PCR (89). **A** Primer und Sonde (*probe*) lagern sich während der Primeranlagerung sequenzspezifisch an die Matrizen-DNA. **B** Die Taq-Polymerase spaltet in der Elongationsphase den Reporterfarbstoff (R) der Sonde ab. **C** Der komplementäre Strang wird synthetisiert. Die Sonde wird abgespalten. **D** Der Reporterfarbstoff entfernt sich vom Quencher (Q) und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist messbar.

Mithilfe der RT-PCR war es möglich, eine Aussage über den Einfluss von Doxorubicin auf die Expression resistenzrelevanter Gene zu treffen. Dazu wurde die Expressionsstärke der Gene *ACT1*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* bei *C. dubliniensis* und *ACT1*, *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* bei *C. glabrata* gemessen. Die für die untersuchten Gene entsprechenden PCR-Ansätze (Tabelle 4) wurden unter der PCR-Box in keimarmen Umgebung pipettiert. Zunächst wurden die cDNA-Proben für einen PCR-Ansatz mit PCR-Wasser in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Alle übrigen Reagenzien für das untersuchte Gen wurden dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und im Anschluss in die 96-Well Mikrotiterplatte übertragen. Danach wurden auch die verdünnten cDNA-Proben in das jeweilige Well der Mikrotiterplatte pipettiert. Jede cDNA-Probe mit den entsprechenden Reagenzien wurde doppelt mitgeführt, so dass die Werte für das untersuchte Gen im weiteren Verlauf gemittelt werden konnten. Zusätzlich wurden Negativkontrollen ohne cDNA für jedes untersuchte Gen mitgeführt, um ausschließen zu können, dass die für die RT-PCR benötigten Reagenzien nicht verunreinigt waren. Bevor die RT-PCR beginnen konnte, wurde die 96-Well Mikrotiterplatte mit einer Abschlussfolie luftdicht verschlossen und 30 s bei $900 \times g$ zentrifugiert.

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die RT-PCR der untersuchten Gene.

PCR-Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
Aktivierung der Platinum Taq-Polymerase	95	180	1
Denaturierung	95	15	
Anlagerung	60*	30	45
Elongation	72	30	
Kühlen	40	120	1

* für *C. dubliniensis ACT1* gilt 58°C

Tabelle 4: Zusammensetzung eines Ansatzes für die RT-PCR.

Reagenzien	Ausgangskonzentration	V [μ l]/Ansatz	Endkonzentration
cDNA-Probe		1 μ l	
Aqua dest		16,3*	
PCR-Puffer	10 \times	2,5	1 \times
MgCl ₂	50 mM	2,25	4,5 mM
dNTP	10 mM	0,5	200 μ M
<i>sense</i> -Primer	10 μ M	1*	400 nM
<i>antisense</i> -Primer	10 μ M	1*	400 nM
Sonde	10 μ M	0,3	132 nM
Taq Polymerase	(0,2 μ l=1 U)	0,15	0,75U / Ansatz
V [μ l]		25,0	

* für *C. dubliniensis ACT1* gilt: Aqua dest 17,55 μ l, *sense*-Primer 0,25 μ l [100 nM] und für *antisense*-Primer 0,5 μ l [200 nM]

Um nun Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene mRNA-Menge zu erhalten, wurde der C_T -Wert (*Threshold Cycle*) oder Schwellenwert bestimmt. Dieser liegt im exponentiellen Teil des PCR-Laufs, der dadurch gekennzeichnet ist, dass hier die Taq-Polymerase am effektivsten arbeiten kann. Im späteren Verlauf der PCR sinkt durch den ständigen Temperaturwechsel die Effektivität der Polymerase und die Anzahl der zu Verfügung stehenden Nukleotide, Primer und Sonden nimmt ab. Zudem verbinden sich zunehmend nicht die Primer mit den Templates, sondern die Templates untereinander, da nicht mehr genug Primer vorhanden sind und die Anzahl der DNA-Templates in der Probe sehr hoch ist. Der C_T -Wert ist definiert als der Zyklus, bei dem zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der Grundlinie erfasst wird. Die Grundlinie kann vom Benutzer vorab bestimmt werden. Je größer also der C_T -Wert, desto kleiner die ursprünglich vorliegende mRNA-Menge und umgekehrt. Mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode konnte jetzt, unter Bezugnahme des C_T -Wertes des Referenzgens *ACT1*, die n-fache Expression der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle errechnet werden. Dazu wurden zunächst die C_T -

Werte der jeweils doppelt angesetzten Proben aller untersuchten Gene gemittelt. Danach wurden die C_T -Werte von *ACT1* von den entsprechenden C_T -Werten der untersuchten Gene subtrahiert (ΔCT). Im folgenden Schritt wurden die C_T -Werte von den untersuchten Genen der unbehandelten Kontrollen von denen der mit Doxorubicin behandelten Proben abgezogen ($\Delta\Delta CT$). Im letzten Schritt wurde anhand der Differenz der C_T -Werte zwischen den behandelten und unbehandelten Proben, die n-fache Expression der mit Doxorubicin behandelten Proben mit folgender Formel berechnet:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

2.2.5. Primeretablierung

Für die Etablierung der Primer wurden unterschiedliche Kombinationen von *sense*- (F, S) und *antisense*- (A, R) Primern in Verdünnungsreihen der entsprechenden cDNA von 1:1 bis 1:1000 im LightCycler amplifiziert. Anschließend wurden die entstandenen PCR-Produkte aller Primerkombinationen auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Dazu wurden 1,2 g Agarose mit 100 ml 1× TBE vermischt und 5 min bei 650 W in der Mikrowelle gekocht. Während das Agarosegel im Magnetrührer abkühlte, wurde es mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und dann in Form gegossen. Nachdem das Gel gehärtet war, wurden je 7 µl der PCR-Produkte mit 3 µl Gelladepuffer vermischt, in die Geltaschen pipettiert und 2 h bei 70 V aufgetrennt. Danach wurden die Banden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und digital fotografiert. Durch die Gelelektrophorese konnte sichergestellt werden, dass entsprechend der Anzahl der Basenpaare das richtige PCR-Produkt vervielfältigt wurde und keine anderen Produkte vorhanden waren.

Anhand der Ergebnisse der Agarosegel-Elektrophorese sowie der Fluoreszenzstärke in der vorangegangenen RT-PCR, die proportional zu der entstandenen DNA-Menge war, konnte eine Primerkombination ausgewählt werden, mit der eine Effizienzmessung durchgeführt wurde. In dieser wurde der Zyklusabstand zwischen den verschiedenen Verdünnungsstufen einer Primerkombination gemessen. Dieser sollte im Idealfall 3,33 betragen, d.h. die DNA-Menge verzehnfacht sich alle 3,33 Zyklen bzw. sie verdoppelt sich pro Zyklus. Ist der Zyklusabstand zwischen den Verdünnungsstufen größer, ist dementsprechend die Effizienz kleiner. Durch Variieren der Magnesiumchloridkonzentration sowie der Temperatur während der Anlagerungsphase konnte anschließend die Effizienz noch erhöht werden. Bei *ACT1* von *C. dubliniensis* mussten zudem asymmetrische Primerkonzentrationen zwischen 100 nM bis 800 nM getestet werden, um die Effizienz der PCR zu erhöhen.

2.2.6. MHK_{Flu} -Bestimmung

Die MHK_{Flu} ermöglichte eine Aussage über den Einfluss von Doxorubicin auf die Resistenzbildung gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol in den ausgewählten *Candida spp.* Sie ist definiert als die Konzentration eines Antimykotikums, bei der sich das Wachstum der Stämme um 80 % im Vergleich zu einer Wachstumskontrolle verringert, die nicht mit dem Antimykotikum behandelt wird. Zur Bestimmung der MHK_{Flu} -Werte wurde die Referenzmethode des *Clinical and Laboratory Standards Institute M27 A2 (CLSI)* angewendet (65). Die in 40 %igen Glycerin und bei $-20^{\circ}C$ eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und 50 μ l zur Subkultivierung entnommen. Diese fand in 3 ml des Mediums statt, welches zuvor in der Kultivierung über 10 Tage verwendet wurde. Bei den mit Doxorubicin behandelten Proben wurde die Doxorubicin-Konzentration von 20 μ g/ml wieder hergestellt. Die Proben wurden über Nacht bei $35^{\circ}C$ ohne Schütteln inkubiert und anschließend 10 min bei $1900 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,9 %ige NaCl-Lösung resuspendiert. Es wurde dabei mithilfe eines Photometers soviel 0,9 %iges NaCl-Lösung hinzugegeben, bis die Konzentration $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml betrug. Die entstandene Suspension wurde dann 1:1000 mit RPMI verdünnt. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit musste hier ein synthetisches Medium verwendet werden. Die MHK_{Flu} -Auswertung erfolgte mithilfe einer Mikrotiterplatte. In der ersten Reihe wurden 100 μ l Fluconazol in einer Konzentration von 8 μ g/ml bei *C. dubliniensis* bzw. 256 μ g/ml bei *C. glabrata* zugegeben. Durch Überführen von jeweils 100 μ l in die nächste Kavität wurde das Antimykotikum verdünnt. Es entstand eine Verdünnungsreihe mit Antimykotikakonzentrationen von 0,0625 μ g/ml bis 8 μ g/ml Fluconazol bei *C. dubliniensis* und 0,5 μ g/ml bis 128 μ g/ml bei *C. glabrata*. Danach wurde in jede der Kavitäten 100 μ l der Zellsuspension zugegeben. Zusätzlich wurde eine Sterilitätskontrolle, die nur Medium enthielt, eine Wachstumskontrolle ohne Antimykotikum und ein Isolat mit bekannter MHK_{Flu} mitgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 48 h bei $35^{\circ}C$ im Brutschrank inkubiert. Die Bestimmung der MHK_{Flu} erfolgte visuell durch Ermittlung der mit dem Wachstum der Zellen einhergehenden Trübung in jeder Kavität. Diese wurde bestimmten Werten zugeordnet. Eine klare Lösung ist Stufe null und eine leichte Trübung ist Stufe eins. Eine gegenüber der Wachstumskontrolle deutlich reduzierte Trübung ist Stufe zwei und eine der Wachstumskontrolle entsprechende Trübung ist Stufe drei. Die MHK_{Flu} wurde nach derjenigen Verdünnung abgelesen, die eine Trübung der Stufe zwei erreichte. Eine MHK_{Flu} bis 8 μ g/ml galt als sensibel. Eine MHK_{Flu} zwischen 16 μ g/ml und 32 μ g/ml galt als intermediär und eine MHK_{Flu} größer gleich 64 μ g/ml war resistent (77). Die MHK_{Flu} -

Messung des 10-Tage Versuchs erfolgte am 1., 2., 3., 6., 8. und 10. Tag. Für die untersuchten *C. dubliniensis*- und *C. glabrata*-Stämme wurden die MHK_{Flu} -Werte auch am 0. Tag, also vor der Behandlung mit Doxorubicin, bestimmt.

Abweichend vom CLSI-Protokoll wurde für *C. dubliniensis* eine modifizierte MHK_{Flu} -Bestimmung (MHK_{Flu}^{mod}) durchgeführt, in der während der 48-stündigen Inkubierung in der Mikrotiterplatte eine Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml bestand. Hierfür wurde exemplarisch der 3., 6. und 10. Tag des 10-Tage-Versuchs in YPD ausgewählt.

2.2.7. Chequerboard-Test

Der Chequerboard-Versuch diente zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Doxorubicin-Konzentrationen auf die Empfindlichkeit von *C. dubliniensis* und *C. glabrata* gegenüber Fluconazol. Es wurden die *C. dubliniensis*- und *C. glabrata*-Stämme auf Sabouraud-Agar über Nacht bei 35°C bebrütet und dann in 0,9 %ige NaCl-Lösung suspendiert. Anschließend wurde mithilfe eines Photometers durch Zugabe weiterer 0,9 %iger NaCl-Lösung eine Konzentration von $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml in der Suspension eingestellt. Die entstandene Suspension wurde 1:1000 mit RPMI verdünnt. Die Konzentrationen von Doxorubicin und Fluconazol wurden, anders als bei der MHK_{Flu} -Bestimmung, vorher berechnet und die Volumina der unterschiedlichen Lösungen entsprechend in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurden Verdünnungsstufen von Doxorubicin in Konzentrationen zwischen 1,25 und 80 µg/ml und Verdünnungsstufen von Fluconazol in Konzentrationen zwischen 0,031 und 16 µg/ml bei *C. dubliniensis* bzw. 0,25 bis 128 µg/ml bei *C. glabrata* in allen möglichen Kombinationen im Chequerboard getestet (Abbildung 11). Zudem wurde das Wachstum in unterschiedlichen Fluconazol-Konzentrationen ohne Doxorubicin sowie in verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen ohne Fluconazol beurteilt. Die Erfassung der MHK_{Flu} erfolgte anhand der Trübung in den Kavitäten, entsprechend der MHK_{Flu} -Bestimmung in Kapitel 2.2.6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F 0 µg/ml D 0 µg/ml	F 16 µg/ml D 0 µg/ml	F 8 µg/ml D 0 µg/ml	F 4 µg/ml D 0 µg/ml	F 2 µg/ml D 0 µg/ml	F 1 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 0 µg/ml	F 0 µg/ml D 0 µg/ml
B	F 0 µg/ml D 80 µg/ml	F 16 µg/ml D 80 µg/ml	F 8 µg/ml D 80 µg/ml	F 4 µg/ml D 80 µg/ml	F 2 µg/ml D 80 µg/ml	F 1 µg/ml D 80 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 80 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 80 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 80 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 80 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 80 µg/ml	F 0 µg/ml D 80 µg/ml
C	F 0 µg/ml D 40 µg/ml	F 16 µg/ml D 40 µg/ml	F 8 µg/ml D 40 µg/ml	F 4 µg/ml D 40 µg/ml	F 2 µg/ml D 40 µg/ml	F 1 µg/ml D 40 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 40 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 40 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 40 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 40 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 40 µg/ml	F 0 µg/ml D 40 µg/ml
D	F 0 µg/ml D 20 µg/ml	F 16 µg/ml D 20 µg/ml	F 8 µg/ml D 20 µg/ml	F 4 µg/ml D 20 µg/ml	F 2 µg/ml D 20 µg/ml	F 1 µg/ml D 20 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 20 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 20 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 20 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 20 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 20 µg/ml	F 0 µg/ml D 20 µg/ml
E	F 0 µg/ml D 10 µg/ml	F 16 µg/ml D 10 µg/ml	F 8 µg/ml D 10 µg/ml	F 4 µg/ml D 10 µg/ml	F 2 µg/ml D 10 µg/ml	F 1 µg/ml D 10 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 10 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 10 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 10 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 10 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 10 µg/ml	F 0 µg/ml D 10 µg/ml
F	F 0 µg/ml D 5 µg/ml	F 16 µg/ml D 5 µg/ml	F 8 µg/ml D 5 µg/ml	F 4 µg/ml D 5 µg/ml	F 2 µg/ml D 5 µg/ml	F 1 µg/ml D 5 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 5 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 5 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 5 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 5 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 5 µg/ml	F 0 µg/ml D 5 µg/ml
G	F 0 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 16 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 8 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 4 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 2 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 1 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 2,5 µg/ml	F 0 µg/ml D 2,5 µg/ml
H	F 0 µg/ml D 0 µg/ml	F 16 µg/ml D 0 µg/ml	F 8 µg/ml D 0 µg/ml	F 4 µg/ml D 0 µg/ml	F 2 µg/ml D 0 µg/ml	F 1 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,5 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,25 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,125 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,0625 µg/ml D 0 µg/ml	F 0,031 µg/ml D 0 µg/ml	F 0 µg/ml D 0 µg/ml

Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Chequerboards von *C. dubliniensis*. F = Fluconazol, D = Doxorubicin.

3. Ergebnisse

3.1. Primeretablierung und Effizienzbestimmung

Zur Bestimmung des Einflusses von Doxorubicin auf die Aktivität von Resistenzgenen bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata* mussten zunächst Primer für die entsprechenden Gene etabliert werden. Hierfür wurden Verdünnungsreihen der cDNA mit allen Kombinationen von *sense* (F, S)- und *antisense* (A, R)-Primern in der RT-PCR erstellt. Idealerweise sollten die Fluoreszenzkurven für die jeweiligen Primerkombinationen in der RT-PCR eine steil verlaufende exponentielle Phase sowie eine hohe Fluoreszenzstärke aufweisen. In Abbildung 12 ist exemplarisch die Primeretablierung von *ERG3* bei *C. dubliniensis* dargestellt. Zu erkennen ist ein RT-PCR-Lauf mit der Primerkombination SR in den verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:1000. Die am höchsten konzentrierte cDNA-Verdünnungsstufe hatte demnach einen C_T -Wert von 26. Der C_T -Wert der folgenden Stufen erhöhte sich dann um jeweils ca. drei Zyklen. Anhand des idealen Zyklusabstandes der unterschiedlichen cDNA-Verdünnungsstufen konnte dann die Effizienz der PCR für jede Primerkombination bestimmt werden. Eine Negativkontrolle wurde für jede Primerkombination in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen mitgeführt.

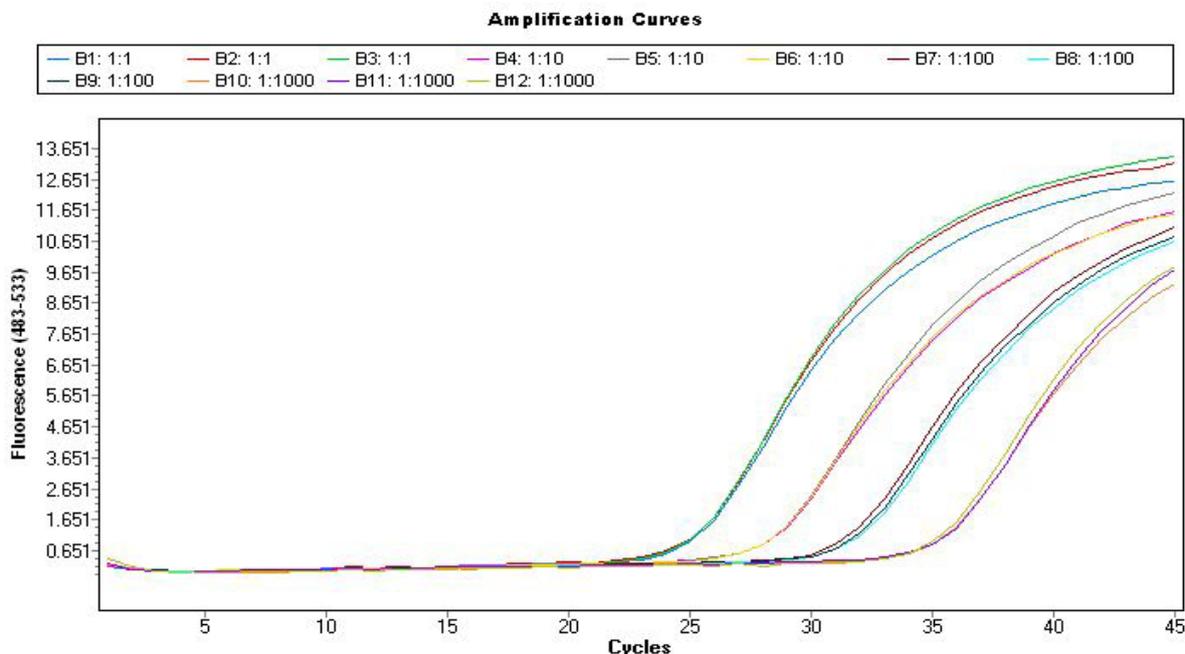


Abbildung 12: RT-PCR-Lauf der Primeretablierung für *ERG3* bei *C. dubliniensis*. Die verwendete Primerkombination ist SR. Die verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen wurden dreifach angesetzt; für jede cDNA-Verdünnungsstufe wurde eine Negativkontrolle mitgeführt und separat ausgewertet.

Im Anschluss daran wurden die bei der RT-PCR entstandenen PCR-Produkte aller Primerkombinationen auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 70 V aufgetrennt. Mithilfe eines Markers konnte die Größe der PCR-Produkte im Gelbild abgeschätzt und mit der berechneten Größe des PCR-Produktes in Basenpaare (bp) verglichen werden. Zudem konnte die Gelelektrophorese ausschließen, dass weitere Produkte in der PCR vervielfältigt wurden. Auch konnte durch die Negativkontrolle, in der anstelle der cDNA Aqua dest. verwendet wurde, sichergestellt werden, dass keine Kontamination mit fremder DNA vorlag. Nur Banden von Primerdimeren waren zu erkennen. Die Gelelektrophorese ist exemplarisch für *ERG3* und *ERG11* von *C. dubliniensis* in der Abbildung 13 dargestellt. Tabelle 5 zeigt die erhaltenen Primerkombinationen und Größen der entstandenen PCR-Produkte.

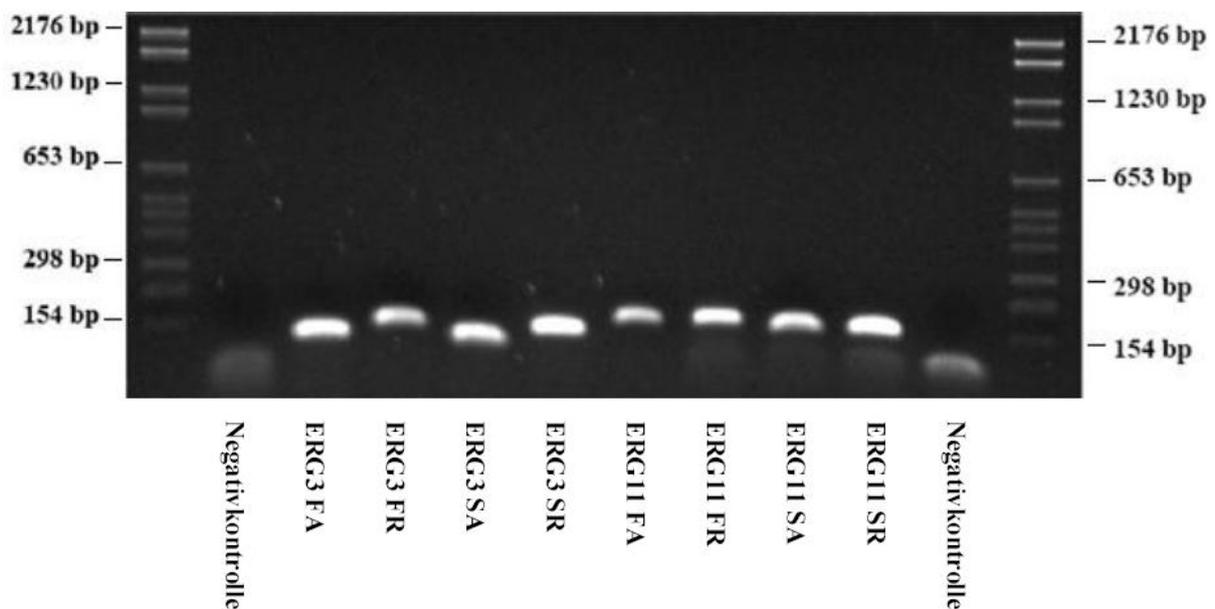


Abbildung 13: Gelbild der verschiedenen Primerkombinationen von *ERG3* und *ERG11* bei *C. dubliniensis* nach erfolgter Amplifikation im LightCycler. 7 μ l der PCR-Probe wurden mit 3 μ l Gelladepuffer aufgetragen. Vom Marker VI wurden 6 μ l verwendet.

Tabelle 5: Übersicht über die optimalen Primerkombinationen und Größe der durch die RT-PCR entstandenen PCR-Produkte.

<i>Candida Spp.</i>	Gen	Primerkombination	bp
<i>C. dubliniensis</i>	<i>ACT1</i>	SA	86
	<i>CDR1</i>	FA	181
	<i>CDR2</i>	FA	258
	<i>MDR1</i>	FA	151
	<i>ERG3</i>	SR	149
	<i>ERG11</i>	SR	158
<i>C. glabrata</i>	<i>ACT1</i>	SA	87
	<i>CDR1</i>	FA	93
	<i>CDR2</i>	FR	144
	<i>SNQ2</i>	SA	169
	<i>PDR1</i>	FA	276

Anhand der Resultate der oben beschriebenen Experimente konnte eine Primerkombination ausgewählt werden, mit welcher der PCR-Lauf in den verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen und die anschließende Effizienzbestimmung wiederholt wurden. In der Abbildung 14 ist die Effizienzbestimmung exemplarisch für *ERG3* von *C. dubliniensis* dargestellt. Der Zyklusabstand zwischen den unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurde mit dem idealen Zyklusabstand für eine Verzehnfachung des PCR-Produktes von 3,33 Zyklen verglichen, woraus die Effizienz der PCR berechnet werden konnte. Die jeweiligen Ansätze für eine Verdünnung (Samples), die durch einen grünen Punkt markiert sind, ermöglichten die Berechnung einer Standardkurve. Die Steigung dieser Gerade gab dabei die Effizienz (Efficiency) wieder. Der Fehler (Error) ermöglichte eine Aussage über die Abweichungen der Samples von der Standardkurve. In Abbildung 14 ist die Effizienz der PCR mit 2,083 hoch und der Fehler mit 0,0656 gering.

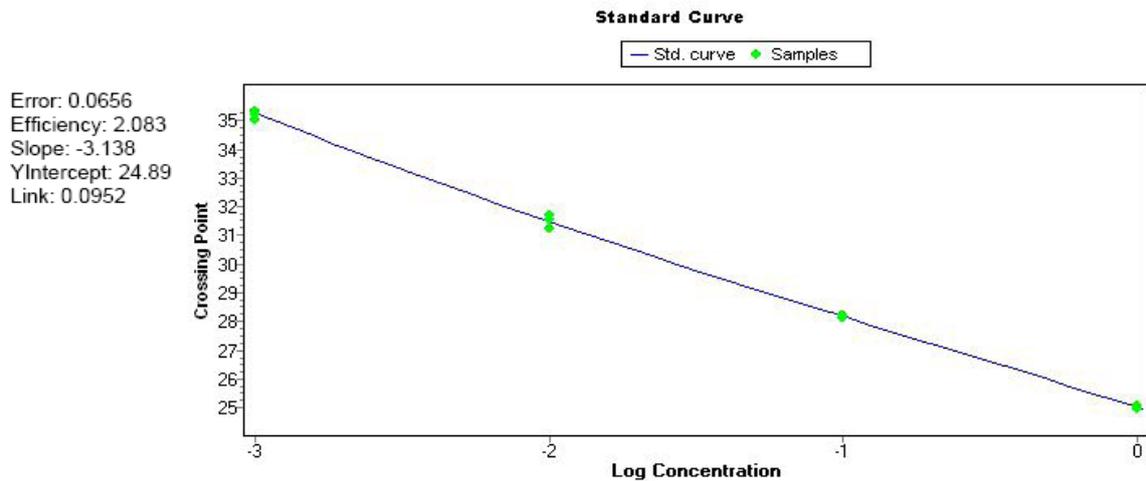


Abbildung 14: Effizienzberechnung anhand der Standardkurve für *ERG3* bei *C. dubliniensis*.

Zur Steigerung der Effizienz konnten die Magnesiumchloridkonzentration und die Temperatur während der Anlagerungsphase variiert werden. Für *ACT1* von *C. dubliniensis* mussten zudem asymmetrische Varianten von Primerkonzentrationen im PCR-Ansatz zwischen 100 nM und 800 nM für den *sense*- bzw. *antisense*-Primer getestet werden, um die Effizienz der RT-PCR zu erhöhen. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die erhaltenen Effizienzen der RT-PCR.

Tabelle 6: Übersicht der ermittelten Effizienzen der RT-PCR für die untersuchten Gene.

Spezies	Gen	Effizienz
<i>C. dubliniensis</i>	<i>ACT1</i>	1,84
	<i>CDR1</i>	1,92
	<i>CDR2</i>	2,10
	<i>MDR1</i>	1,91
	<i>ERG3</i>	2,08
	<i>ERG11</i>	2,05
<i>C. glabrata</i>	<i>ACT1</i>	1,97
	<i>CDR1</i>	1,98
	<i>CDR2</i>	1,98
	<i>SNQ2</i>	1,93
	<i>PDR1</i>	1,92

3.2. Doxorubicin-Einfluss auf die Expression von Resistenzgenen und auf die Fluconazol-Toleranz bei *C. dubliniensis*

Um eine Aussage über den Einfluss von Doxorubicin auf die Aktivität von Resistenzmechanismen von *C. dubliniensis* zu ermöglichen, wurde die Expression der Gene *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* untersucht. Die Kultivierung über 10 Tage und der Versuch über 90 min fanden in YPD und RPMI + iFKS statt.

3.2.1. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD/RPMI + iFKS über 90 min

Nach der Kultivierung in YPD zeigte sich eine Aktivierung von *CDR1* bei den *C. dubliniensis*-Isolaten DSM 13268 und Cd1. Die Expression war um das 1,7 bzw. 2,0-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Isolate Cd2 und Cd3 aktivierten *CDR1* nicht. Die Expression von *CDR2* der mit Doxorubicin behandelten Probe war bei allen untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten um das 2,3-5,2-fache gesteigert. *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* wurden von den untersuchten Isolaten in diesem Medium nicht aktiviert.

Nach der Kultivierung in RPMI + iFKS zeigte sich eine Steigerung der Expression von *CDR1* um das 1,4-1,8-fache der unbehandelten Kontrolle bei den *C. dubliniensis*-Isolaten DSM 13268, Cd1 und Cd3. Die mit Doxorubicin behandelte Probe von Cd2 wies keine Expressionssteigerung von *CDR1* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. *CDR2* wurde bei allen untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten sehr stark aktiviert. Die Expression dieses Gens war bei DSM 13268 um das 23,0-fache und bei Cd1-3 um das 7,8-10,9-fache erhöht. *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* wurden bei allen *C. dubliniensis*-Isolaten nicht aktiviert (Abbildung 15).

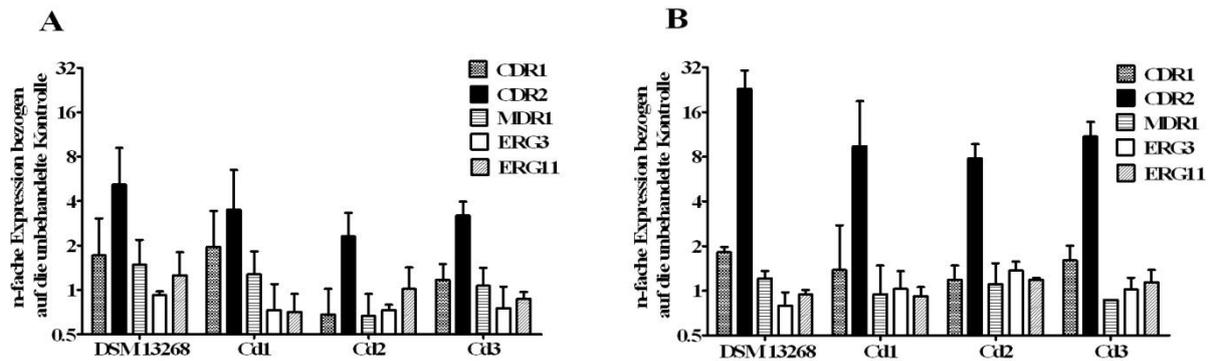


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse von *C. dubliniensis*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in A) YPD bzw. B) RPMI + iFKS ± 20 µg/ml Doxorubicin über 90 min. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression ± Standardabweichung der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Die Kultivierung von *C. dubliniensis* über 90 min zeigte demnach eine leichte Aktivierung von *CDR1*, die in beiden Medien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gleich stark ausgeprägt war. Die Steigerung der Expression von *CDR2* fiel stärker aus als die von *CDR1* und war in den in YPD kultivierten Proben schwächer ausgeprägt als in den in RPMI + iFKS kultivierten Proben. Auf die Expression von *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* hatte Doxorubicin in keines der verwendeten Medien einen Einfluss.

3.2.2. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD über 10 Tage

Der *C. dubliniensis*-Stamm DSM 13268 wies eine starke Aktivierung des *CDR2*-Gens auf. Die Expression stieg vom 2,4-fachen am 1. Tag bis zum 8,3-fachen der unbehandelten Kontrolle am 10. Tag. Die Expression von *CDR2* war bei dem *C. dubliniensis*-Isolat Cd1 sogar noch stärker. Hier stieg die Expression bei der mit Doxorubicin behandelten Probe vom 2,4-fachen am 1. Tag bis zum 11,9-fachen am 10. Tag. Cd2 und Cd3 zeigten ebenfalls eine Aktivierung von *CDR2*, jedoch war diese nicht so stark ausgeprägt und zeigte auch einen anderen Verlauf. Die Expression war bei diesen beiden *C. dubliniensis*-Isolaten mit Ausnahme des 6. Tages um den Faktor 2,7-3,6 bei Cd2 und 2,0-4,7 bei Cd3 erhöht. Am 6. Tag war dieser Wert um das 10,3 bzw. 9,3-fache erhöht. Die Expression von *CDR1*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* war bei keinen der untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten gesteigert. Diese Gene wurden demnach bei einer Kultivierung der *C. dubliniensis*-Isolate in YPD durch Doxorubicin nicht beeinflusst (Abbildung 16).

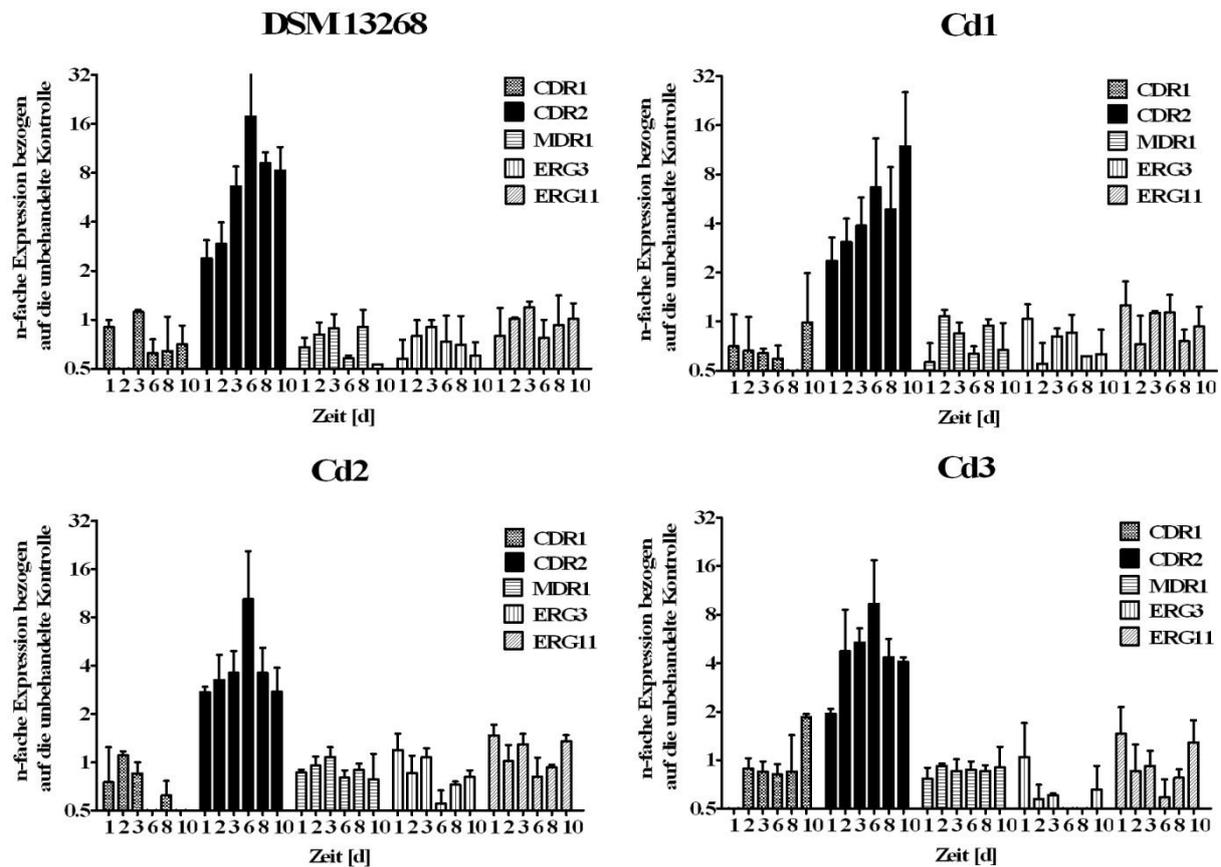


Abbildung 16: Genexpressionsanalyse von *C. dubliniensis*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in YPD ± 20 µg/ml Doxorubicin über 10 Tage. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression ± Standardabweichung der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

3.2.3. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage

Erkennbar ist eine starke Erhöhung der *CDR2*-Expression bei den mit Doxorubicin behandelten Proben bei allen untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten. Die Expression war besonders am 1., 2. und 8. Tag Untersuchungstag um den Faktor 3,0-8,6 erhöht. Cd2 zeigte die stärkste Aktivierung von *CDR2*. Am 3. und 6. Tag war die Expression von *CDR2* am schwächsten ausgeprägt, aber dennoch um das 1,1-2,2-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Expression von *MDR1* war ebenfalls gesteigert und zeigte bei allen untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten einen ähnlichen Verlauf. Sie war gegenüber der unbehandelten Kontrolle am 2. und 8. Tag um das 4,1 bzw. 2,3-fache bei Cd2 erhöht, bei den anderen Isolaten um das 2,0-2,6 bzw. 1,2-1,7-fache. Die Expression von *CDR1*, *ERG3* und *ERG11* war nicht erhöht (Abbildung 17).

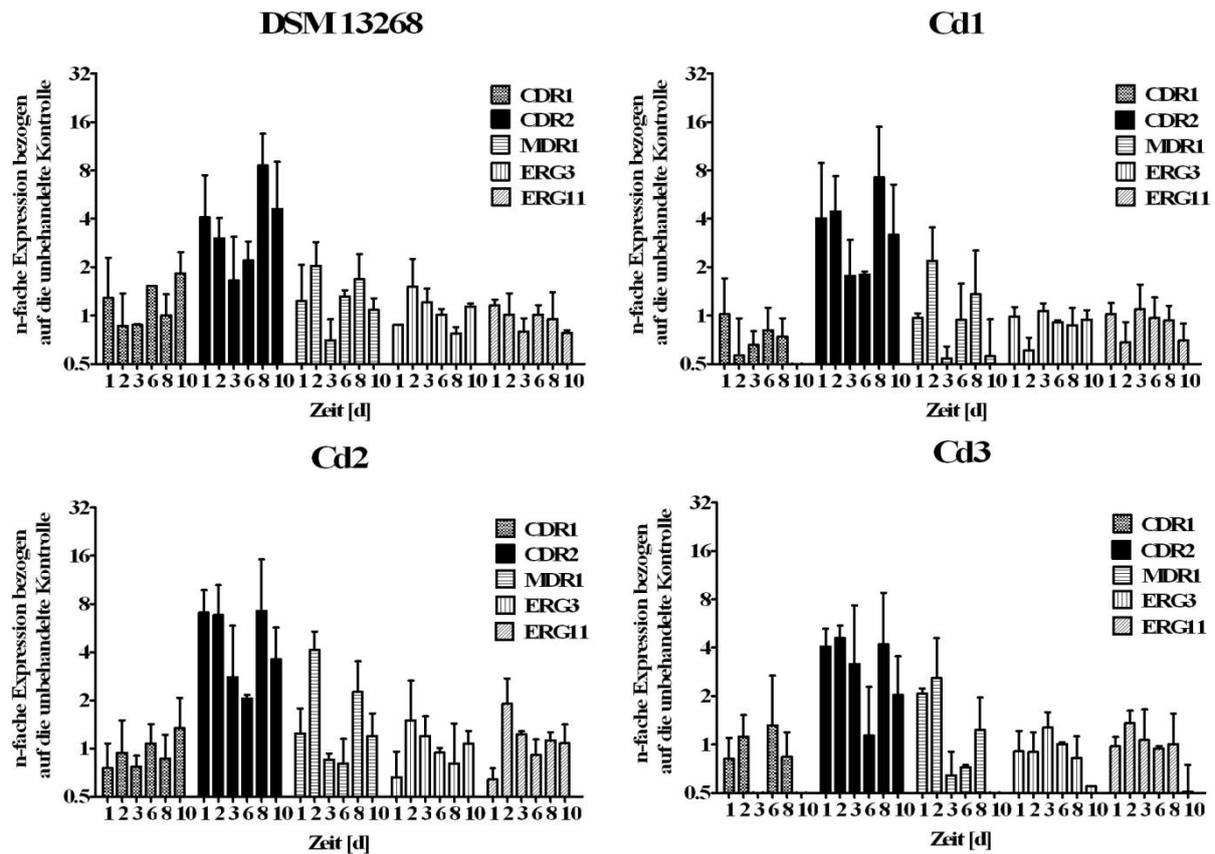


Abbildung 17: Genexpressionsanalyse von *C. dubliniensis*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in RPMI + iFKS \pm 20 μ g/ml Doxorubicin über 10 Tage. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression \pm Standardabweichung der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Die Behandlung mit Doxorubicin verursachte demnach bei den in RPMI + iFKS kultivierten *C. dubliniensis*-Isolaten ebenfalls eine deutliche Aktivierung des *CDR2*-Gens. Der Verlauf der *CDR2*-Expression war im Gegensatz zu den in YPD kultivierten Proben jedoch anders. Die stärkste Aktivierung fand hier am 2. und 8. Tag statt, wohingegen die in YPD kultivierten *C. dubliniensis*-Isolate am 6. Tag die stärkste *CDR2*-Aktivierung aufwiesen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht der gemittelten n-fachen Expression der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der Gene *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* bei den untersuchten *C. dubliniensis*-Isolaten in der Kultivierung über 10 Tage.

Medium	Tag	<i>C. dubliniensis</i> DSM 13268						<i>C. dubliniensis</i> Cd1						<i>C. dubliniensis</i> Cd2						<i>C. dubliniensis</i> Cd3														
		<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG3</i>	<i>ERG11</i>		<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG3</i>	<i>ERG11</i>		<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG3</i>	<i>ERG11</i>		<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG3</i>	<i>ERG11</i>		<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	<i>ERG3</i>	<i>ERG11</i>				
YPD	1	0,90	2,38	0,68	0,58	0,80	0,71	2,35	0,56	1,04	1,26	0,75	2,74	0,86	1,19	1,47	0,45	1,95	0,77	1,05	1,46													
	2	0,48	2,92	0,81	0,80	1,01	0,66	3,07	1,08	0,55	0,73	1,11	3,25	0,96	0,86	1,02	0,89	4,74	0,92	0,57	0,86													
	3	1,12	6,59	0,89	0,90	1,19	0,64	3,88	0,85	0,82	1,13	0,85	3,60	1,08	1,08	1,29	0,85	5,37	0,86	0,61	0,92													
	6	0,62	17,69	0,58	0,73	0,77	0,59	6,64	0,63	0,86	1,14	0,46	10,35	0,80	0,55	0,81	0,82	9,32	0,87	0,39	0,59													
	8	0,64	9,16	0,90	0,70	0,93	0,31	4,85	0,95	0,61	0,76	0,62	3,60	0,90	0,72	0,93	0,85	4,33	0,86	0,48	0,78													
	10	0,71	8,25	0,53	0,60	1,01	0,99	11,86	0,67	0,63	0,93	0,48	2,75	0,78	0,81	1,34	1,85	4,07	0,90	0,66	1,29													
	RPMI + iFKS	1	1,28	4,07	1,23	0,87	1,15	1,02	4,02	0,97	0,99	1,02	0,75	7,06	1,24	0,66	0,64	0,81	4,05	2,08	0,91	0,97												
		2	0,86	3,02	2,04	1,51	1,01	0,56	4,43	2,19	0,61	0,68	0,94	6,81	4,12	1,50	1,90	1,12	4,59	2,58	0,90	1,36												
		3	0,87	1,65	0,70	1,21	0,80	0,66	1,76	0,54	1,07	1,09	0,77	2,79	0,85	1,20	1,23	0,45	3,17	0,64	1,27	1,06												
		6	1,52	2,20	1,32	1,01	1,01	0,81	1,80	0,94	0,91	0,96	1,08	2,06	0,81	0,94	0,91	1,31	1,13	0,72	1,01	0,94												
8		1,00	8,57	1,68	0,77	0,94	0,74	7,23	1,35	0,87	0,93	0,87	7,23	2,26	0,81	1,13	0,83	4,19	1,23	0,82	1,00													
10		1,83	4,60	1,08	1,14	0,78	0,48	3,18	0,56	0,94	0,70	1,34	3,60	1,20	1,07	1,08	0,32	2,03	0,46	0,55	0,51													



3.2.4. MHK_{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in YPD über 10 Tage

In Tabelle 8 sind die MHK_{Flu} -Werte der in YPD kultivierten *C. dubliniensis*-Isolate dargestellt. Sie variierten über den gesamten Versuchszeitraum in den einzelnen Isolaten um maximal eine Titerstufe. Bei den Stämmen DSM 13268, Cd1 und Cd3 lagen die MHK_{Flu} -Werte größtenteils bei 0,125 µg/ml, während sie bei Cd2 überwiegend bei 0,25 µg/ml lagen.

Tabelle 8: Dargestellt sind die MHK in µg/ml Fluconazol für die untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate, die in YPD kultiviert wurden. In Klammern sind die MHK_{Flu} der unbehandelten Kontrollen.

Tag	DSM 13268	Cd1	Cd2	Cd3
0	0,25	0,25	0,25	0,25
1	0,25 (0,125)	0,25 (0,125)	0,25 (0,25)	0,25 (0,25)
2	0,125 (0,25)	0,25 (0,125)	0,5 (0,25)	0,25 (0,125)
3	0,125 (0,125)	0,125 (0,125)	0,25 (0,25)	0,125 (0,125)
6	0,25 (0,25)	0,25 (0,25)	0,5 (0,25)	0,25 (0,25)
8	0,125 (0,125)	0,125 (0,125)	0,25 (0,25)	0,125 (0,125)
10	0,125 (0,125)	0,125 (0,125)	0,25 (0,25)	0,125 (0,125)

Um den Einfluss auf die Methode der MHK_{Flu} -Bestimmung zu untersuchen, wurde in einem weiteren Experiment, in dem die mit Doxorubicin behandelten sowie die unbehandelten Kontrollen auch während der MHK_{Flu} -Bestimmung einer Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml ausgesetzt waren, durchgeführt. Diese MHK_{Flu}^{mod} wurden exemplarisch für den 3., 6. und 10. Tag erstellt. In Tabelle 9 ist ersichtlich, dass die MHK_{Flu}^{mod} der einzelnen Isolate während des Versuchszeitraumes um maximal eine Titerstufe variierten. Die mit Doxorubicin behandelten und unbehandelten Kontrollen der Stämme DSM 13268, Cd1 und Cd3 zeigten eine MHK_{Flu}^{mod} um 0,5 µg/ml. Der Stamm Cd2 wies eine MHK_{Flu}^{mod} um 2 µg/ml auf. Die MHK_{Flu}^{mod} der zuvor nicht mit Doxorubicin behandelten Proben wichen nur bei DSM 13268 am 3. Tag und bei Cd2 am 10. Tag um eine Titerstufe von den MHK_{Flu}^{mod} der mit Doxorubicin behandelten Proben ab.

Tabelle 9: Dargestellt sind die MHK_{Flu}^{mod} in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol für die untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate am 3., 6. und 10. Tag des 10-Tage Versuchs in YPD. Während der 48-stündigen Inkubation im Rahmen der MHK-Bestimmung wurde abweichend vom CLSI-Protokoll eine Doxorubicin-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. In Klammern sind die MHK_{Flu}^{mod} der unbehandelten Kontrollen.

Tag	DSM 13268	Cd1	Cd2	Cd3
3	0,5 (1)	0,5 (0,5)	2 (2)	0,5 (0,5)
6	0,5 (0,5)	0,5 (0,5)	2 (2)	0,5 (0,5)
10	0,5 (0,5)	0,5 (0,5)	4 (2)	0,5 (0,5)

3.2.5. MHK_{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage

Die MHK_{Flu} der in RPMI + iFKS kultivierten *C. dubliniensis*-Isolate blieben stabil bei 0,125 $\mu\text{g/ml}$ \pm eine Titerstufe bei den Stämmen DSM 13268, Cd1 und Cd3, bzw. 0,25 $\mu\text{g/ml}$ \pm eine Titerstufe bei den Stamm Cd2. Auf eine Tabelle wurde verzichtet.

Alle untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate veränderten die MHK_{Flu} demnach im Verlauf der 10-Tage Kinetik, unabhängig vom Medium, unter der Gabe von Doxorubicin nicht. Bei Verwendung einer Doxorubicin-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ während der MHK_{Flu} -Bestimmung variierten die so erstellten MHK_{Flu}^{mod} im Verlauf des Untersuchungszeitraumes ebenfalls kaum. Jedoch lagen die MHK_{Flu}^{mod} sowohl bei den mit Doxorubicin behandelten, als auch bei den unbehandelten Kontrollen um eine bis vier Titerstufen über den anhand des CLSI-Protokolls erstellten MHK_{Flu} . Alle mitgeführten Wachstumskontrollen wiesen durch ihr Wachstum eine Trübung der Stufe drei auf. Die Negativkontrollen blieben ohne Wachstum.

3.2.6. Fluconazol-Doxorubicin Chequerboard-Test bei *C. dubliniensis*

In der Abbildung 18 sind die MHK_{Flu} bei den untersuchten Doxorubicin-Konzentrationen dargestellt. Zu erkennen ist, dass die *C. dubliniensis*-Isolate DSM 13268 und Cd1 ohne den Zusatz von Doxorubicin eine MHK_{Flu} von 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen. Diese stieg bei DSM 13268 auf 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und bei Cd1 auf 0,25 $\mu\text{g/ml}$ bei einer Doxorubicin-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$, was eine Erhöhung um drei bzw. zwei Titerstufen entsprach. Cd2 wies ohne Doxorubicin eine MHK_{Flu} von 0,125 $\mu\text{g/ml}$ auf, die bei einer Doxorubicin-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ auf 2 $\mu\text{g/ml}$ oder um vier Titerstufen stieg. Das *C. dubliniensis*-Isolat Cd3 zeigte ohne Doxorubicin eine MHK_{Flu} von 0,0625 $\mu\text{g/ml}$. Diese stieg bei einer Doxorubicin-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,25 $\mu\text{g/ml}$ oder um zwei Titerstufen. DSM 13268, Cd1 und

Cd3 zeigten bei einer Doxorubicin-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ kein Wachstum mehr. Cd2 wuchs bei einer Doxorubicin-Konzentration von 80 $\mu\text{g/ml}$ nicht mehr.

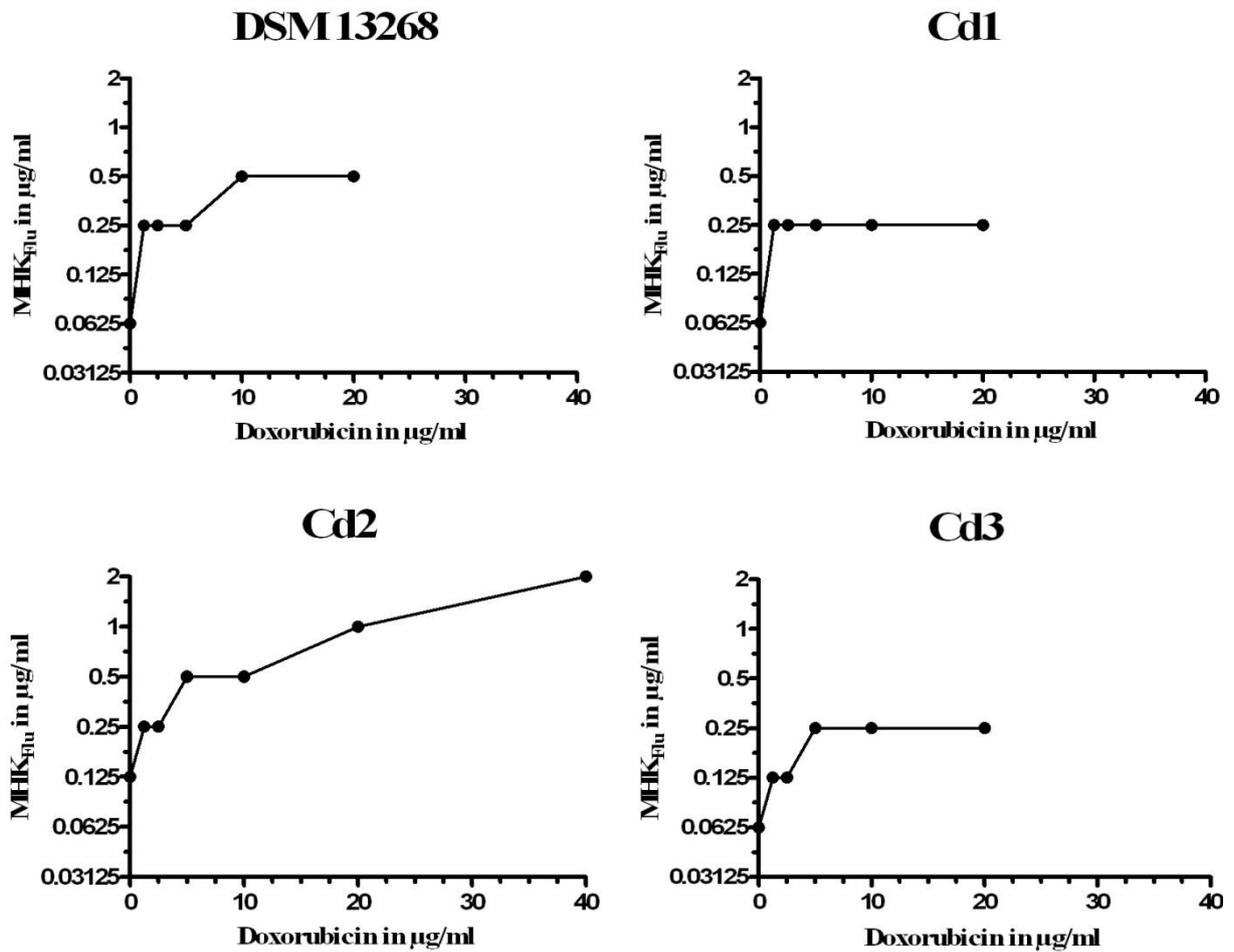


Abbildung 18: Dargestellt sind die MHK in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol bei verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen in $\mu\text{g/ml}$ für die untersuchten *C. dubliniensis*-Isolate.

3.3. Doxorubicin-Einfluss auf die Expression von Resistenzgenen und auf die Fluconazol-Toleranz bei *C. glabrata*

Um einen möglichen Effekt von Doxorubicin auf die Aktivierung von Resistenzgenen bei *C. glabrata* nachzuweisen, wurde die Expression der Gene *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* untersucht. Die Kultivierung über 10 Tage fand in YPD, RPMI + iFKS und YNB statt. Der 90-min Versuch wurde in YPD und YNB durchgeführt.

3.3.1. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD/YNB über 90 min

Die Abbildung 19 zeigt die n-fache Expression der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle für die verschiedenen *C. glabrata*-Isolate.

Nach der Kultivierung über 90 min in YPD war zu erkennen, dass die *CDR1*-Expression nur bei den *C. glabrata*-Isolaten DSM 11950 und Cg4 um das 2,5 bzw. 1,9-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht war. In allen anderen Isolaten war die *CDR1*-Expression nicht erhöht. *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* wurden bei keinem der untersuchten Isolate vermehrt exprimiert. Nach der Kultivierung in YNB ist die *CDR1*-Expression nur bei Cg1 um das 1,5-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle gesteigert. In allen anderen Isolaten war die *CDR1*-Expression nicht erhöht. *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* wurden bei keinem der untersuchten Isolate vermehrt exprimiert.

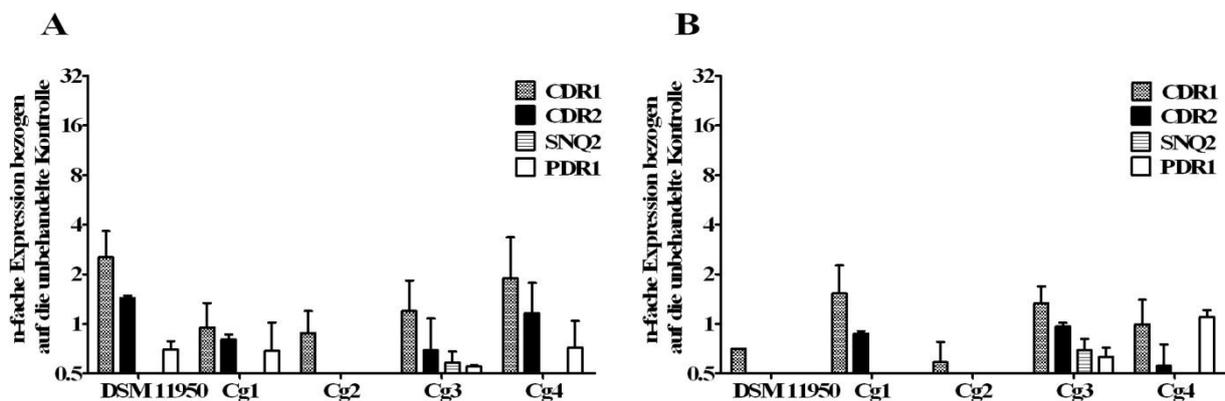


Abbildung 19: Genexpressionsanalyse von *C. glabrata*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in A) YPD bzw. B) YNB \pm 20 μ g/ml Doxorubicin über 90 min. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression \pm Standardabweichung der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Doxorubicin nach einer 90-minütigen Kultivierung in keines der Medien einen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Gene hatte.

3.3.2. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YPD über 10 Tage

DSM 11950 zeigte eine starke Aktivierung von *CDR1* am 2., 3., 8. und 10. Tag. Die Expression von *CDR1* war um das 2,8-6,2-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Expressionen von *CDR2* und *SNQ2* zeigten einen ähnlichen Verlauf mit einer Aktivierung dieser Gene am 2., 8., und 10. Tag. Jedoch waren die Expressionen dieser Gene bei der mit Doxorubicin behandelten Probe nicht so stark erhöht wie die von *CDR1*. Die Expression von *PDR1* war nur am 1. und 10. Tag um das 1,8- bzw. 1,6-fache erhöht.

Cg1 wies besonders am 1.-3. Tag eine gesteigerte Expression von *CDR1* auf, die um das 5,0-8,5-fache erhöht war und an den folgenden Tagen auf das 1,5-3,1-fache der unbehandelten Kontrolle sank. Die Gene *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* wurden ebenfalls aktiviert, jedoch nicht so stark wie *CDR1*. Hier war die Expression der mit Doxorubicin behandelten Proben am 1.-3. Tag um das 1,4-4,1-fache der unbehandelten Kontrolle gesteigert. In den folgenden Tagen war die Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weniger stark erhöht.

Cg2 zeigte auch eine starke Aktivierung von *CDR1*. Hier war die Expression am 3. Tag um das 19,0-fache und an den anderen Tagen um das 0,8-6,8-fache erhöht. Die Gene *CDR2* und *SNQ2* wurden auch verstärkt exprimiert. Die Aktivitätssteigerung dieser Gene war aber wie bei den zuvor untersuchten *C. glabrata*-Isolaten weniger ausgeprägt als die von *CDR1*. Die Expression von *PDR1* erhöhte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ebenfalls, vorwiegend am 1.-3. und 10. Tag. Sie war um das 1,7-2,2-fache gesteigert.

Der fluconazolresistente Stamm Cg3 wies nur am 2. Tag eine leichte Aktivierung der Gene *CDR1*, *CDR2* und *SNQ2* auf. Die Expression dieser Gene war um das 2,2-2,4-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht.

Der ebenfalls fluconazolresistente Stamm Cg4 zeigte dagegen eine starke Aktivierung von *CDR1*. Diese war um das 1,8-4,7-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Gene *CDR2* und *SNQ2* wurden am 1., 6. und 10. Tag verstärkt exprimiert. Die Expression war hier um das 1,8-2,8-fache erhöht. Das Gen *PDR1* wurde hingegen über den gesamten Zeitraum des Experimentes aktiviert. Die Expression von *PDR1* lag um das 1,4-2,9-fache über den Wert der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 20).

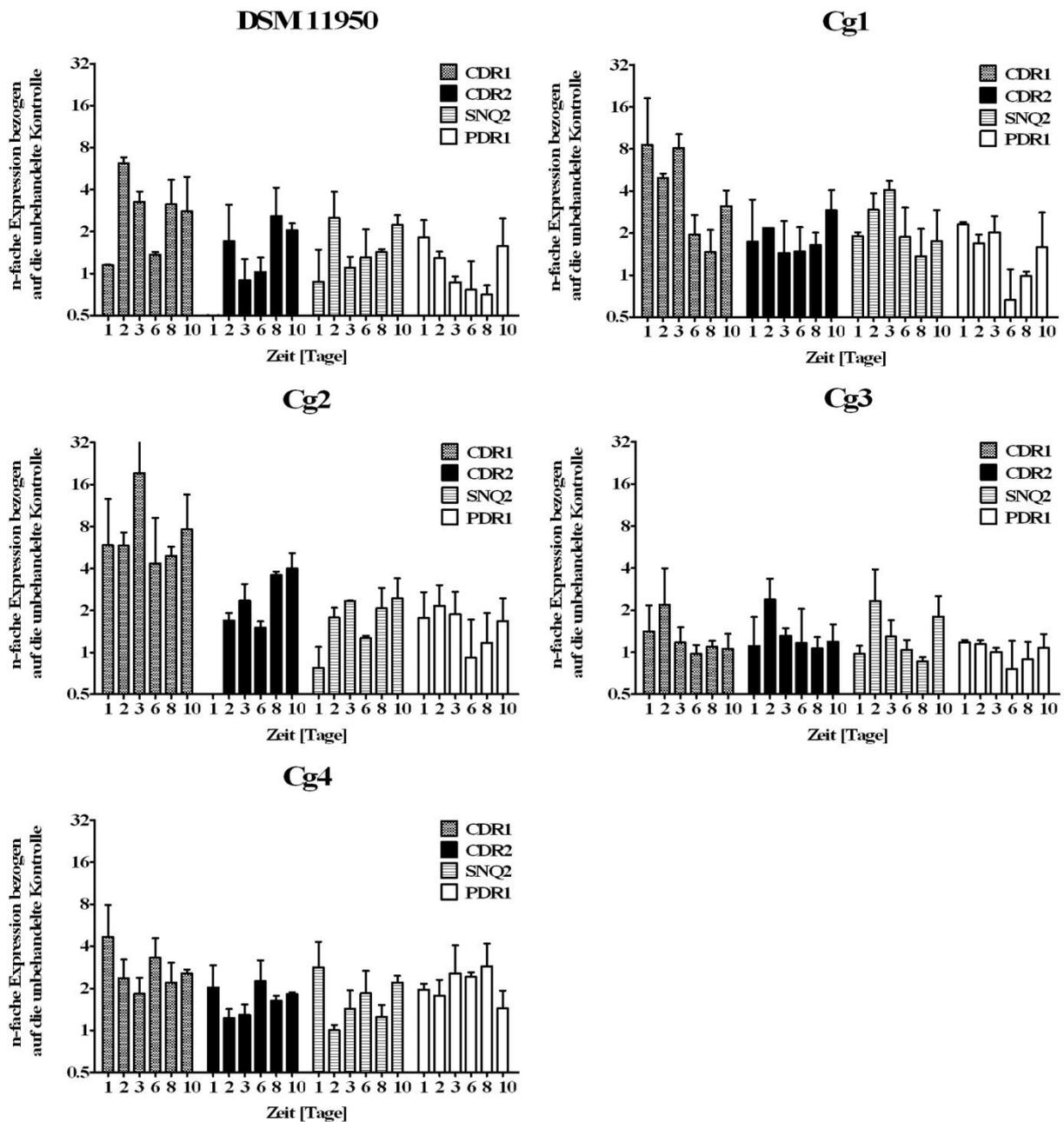


Abbildung 20: Genexpressionsanalyse von *C. glabrata*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in YPD ± 20 µg/ml Doxorubicin über 10 Tage. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression ± Standardabweichung der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

3.3.3. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage

Die Kultivierung von *C. glabrata* gelang in RPMI + iFKS nur mit den fluconazolresistenten Isolaten Cg3 und Cg4. DSM 11950, Cg1 und Cg2 zeigten in diesem Medium kein ausreichendes Wachstum, um Proben für die RNA-Extraktion zu gewinnen.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aktivierte Cg3 keines der untersuchten Gene. Cg4 hingegen veränderte deutlich sein Expressionsmuster. Die Gene *CDR1*, *CDR2* und *SNQ2* wiesen am 1. Tag eine 11,2-15,5-fache Expressionssteigerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Bis zum 6. Tag sanken diese Werte auf das 1,6-2,9-fache. Am 8. Tag stieg die Expression der drei Gene leicht und am 10. Tag sanken sie wieder auf das Niveau des 6. Tages. Der Verlauf der Aktivierung von *PDR1* entsprach dem der drei zuvor genannten Gene. Jedoch fiel hier die Steigerung der Expression nicht so stark aus. Am 1. Tag war die Expression um das 5,1-fache erhöht. Bis zum 10. Tag sank sie auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 21).

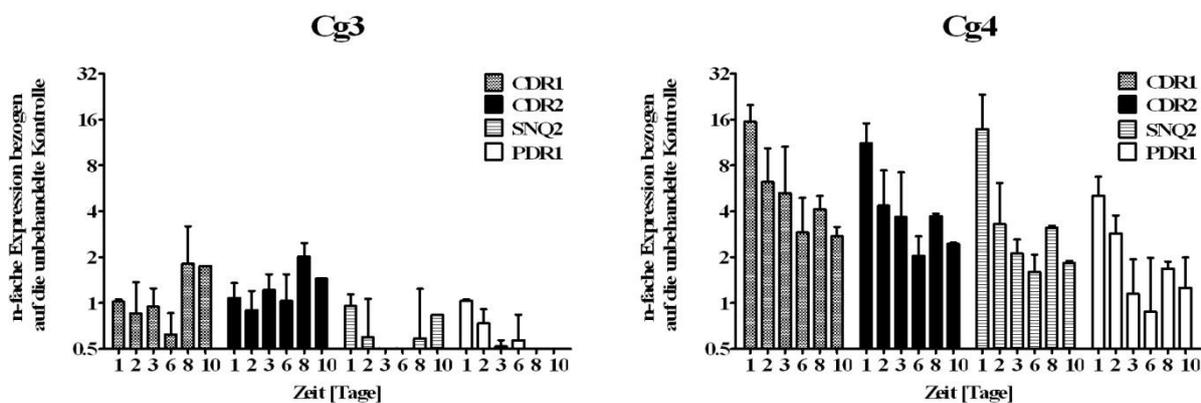


Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von *C. glabrata*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in RPMI + iFKS ± 20 µg/ml Doxorubicin über 10 Tage. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression ± Standardabweichung der untersuchten Gene in der Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

3.3.4. Genexpressionsanalyse bei Kultivierung in YNB über 10 Tage

DSM 11950 wies am 1., 2. und 8. Tag eine starke Aktivierung aller untersuchten Gene auf. Am deutlichsten fiel diese bei *CDR1* aus. Die Expression dieses Gens war am 1. Tag um das 12,7-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Am 2. und 8. Tag lag dieser Wert bei dem 6,3 bzw. 5,2-fachem. Am 6. und 10. Tag lag die Expression von *CDR1* bei der mit Doxorubicin behandelten Probe nur um das 1,6 bzw. 1,5-fache über der der Kontrolle. Die Aktivierung der anderen untersuchten Gene zeigte den gleichen Verlauf. Jedoch war hier die Stärke der Expressionssteigerung geringer.

Cg1 zeigte besonders am 1. und 2. Tag eine Aktivierung von *CDR1*. Sie war bei der mit Doxorubicin behandelten Probe um das 9,1 bzw. 5,9-fache erhöht. Bis zum 10. Tag sank die Expression von *CDR1* unterhalb der der unbehandelten Kontrolle. Die Aktivierung der

anderen untersuchten Gene zeigte einen ähnlichen Verlauf, wobei diese, im Vergleich zu der von *CDR1*, weniger ausgeprägt war.

Cg2 wies vor allem am 1., 2. und 8. Tag eine deutliche Steigerung der Expression der untersuchten Gene auf. Sie war an den genannten Tagen bei *CDR1* um das 10,3, 3,7, bzw. 2,6-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Expression der Gene *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* war am 1. Tag um das 3,7-5,4-fache und am 2. und 8. Tag um das 1,8-3,2-fache der unbehandelten Kontrolle gesteigert. An den anderen Tagen lag die Expression von *CDR1* und *SNQ2* um das 1,4-2,7-fache über der der unbehandelten Kontrolle. Die mit Doxorubicin behandelten Proben zeigten an diesen Tagen keine Aktivierung von *CDR2* und *PDR1*.

Cg3 wies am 2. und 6. Tag eine 2,3-4,5-fache Steigerung der *CDR1*- und *CDR2*-Expression sowie am 6. Tag eine 2,4-fache Erhöhung der *SNQ2*-Expression auf. An den übrigen Tagen konnte kein Effekt von Doxorubicin auf die untersuchten Gene nachgewiesen werden.

Cg4 aktivierte die untersuchten Gene besonders am 1.-3. und 8. Tag. Die Expression von *CDR1* war an diesen Tagen um das 6,8-9,8 bzw. 5,0-fache, am 6. und 10. Tag um das 2,2 bzw. 2,0-fache der unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Gene *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* steigerten ihre Aktivität am 1.-3. Tag um das 2,8-5,0-fache und am 8. Tag um das 2,1-3,4-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Am 6. Tag wies die mit Doxorubicin behandelte Probe keine Expressionssteigerung der Gene *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Am 10. Tag war die Expression der Gene *CDR2* und *SNQ2* ebenfalls nicht erhöht. Die Expression von *PDR1* hingegen war am 10. Tag um das 2,5-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 22).

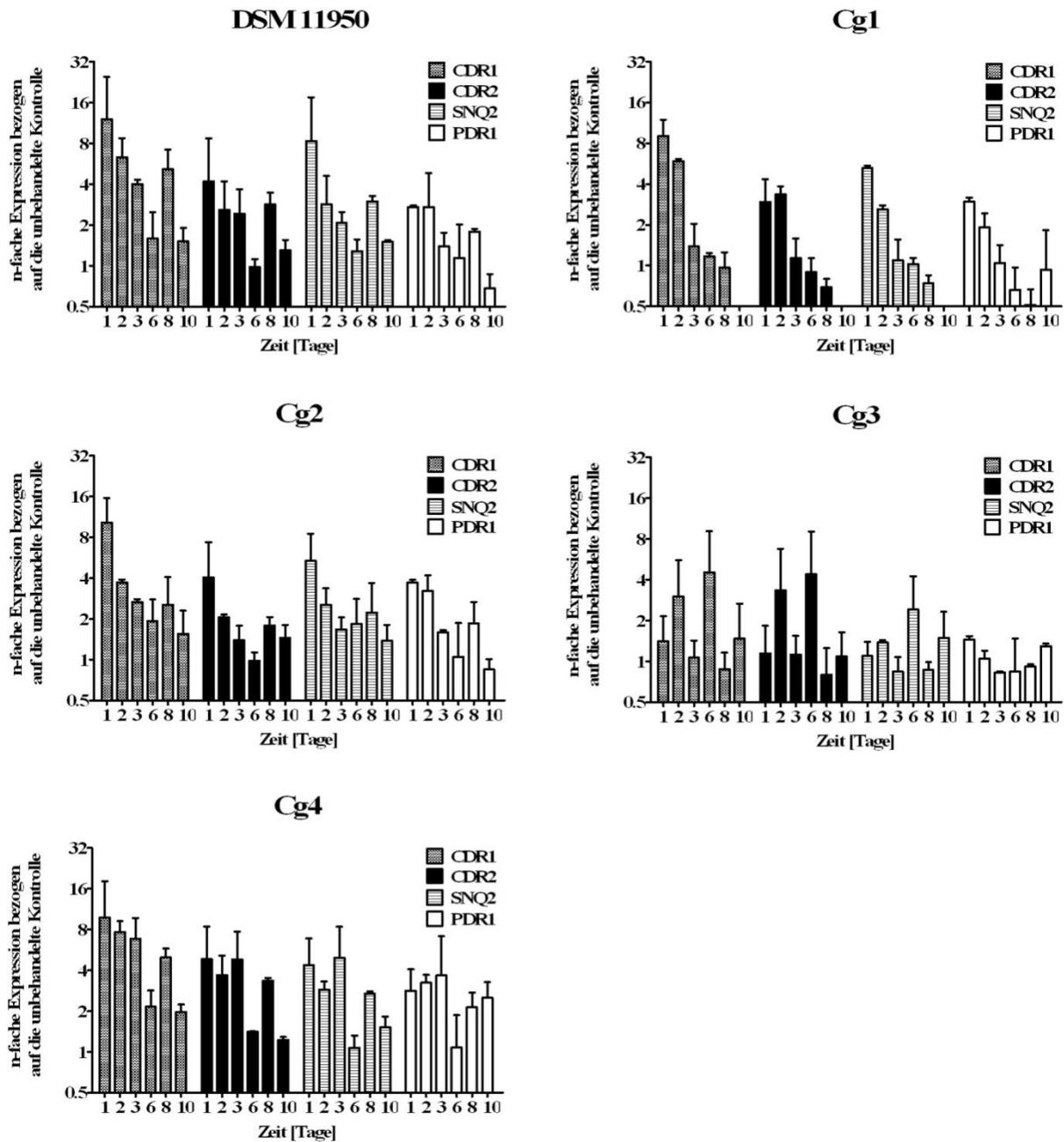


Abbildung 22: Genexpressionsanalyse von *C. glabrata*. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in YNB \pm 20 μ g/ml Doxorubicin über 10 Tage. Die Balkendiagramme repräsentieren die n-fache Expression \pm Standardabweichung der untersuchten Gene in der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Expressionswerte jeweils doppelt bestimmt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Der Einfluss von Doxorubicin auf die untersuchten Gene konnte in allen Medien, in denen die *C. glabrata*-Isolate kultiviert wurden, nachgewiesen werden. Die Expressionssteigerung von *CDR1* fiel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in allen Medien am höchsten aus. Die in YPD kultivierten Stämme zeigten gegenüber den in YNB kultivierten Proben keine signifikanten Änderungen in der Expressionsstärke der untersuchten Gene. Der Verlauf der Genexpression in den unterschiedlichen Medien unterschied sich jedoch bei DSM 11950,

Cg1, Cg2 und Cg4. Während sich die Expression der in YPD kultivierten Proben über den Untersuchungszeitraum nur gering veränderte, konnte man bei den in YNB kultivierten Proben sehen, dass die Aktivierung der untersuchten Gene am stärksten an den ersten Untersuchungstagen ausfiel und an den folgenden Tagen sank. Das Medium hatte demnach einen Einfluss auf den Verlauf der Expressionssteigerung. In RPMI + iFKS zeigte Cg4 die stärkste Aktivierung der untersuchten Gene im Vergleich zu der Kultivierung in YPD und YNB. Der Verlauf der Genexpression in RPMI + iFKS entsprach der in YNB. Das *C. glabrata*-Isolat Cg3 zeigte in allen Medien keine doxorubicininduzierte Expression der untersuchten Gene (Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht der gemittelten n-fachen Expressionen der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der Gene *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* bei den untersuchten *C. glabrata*-Isolaten in der Kultivierung über 10 Tage.

Tag	Medium	<i>C. glabrata</i> DSM 11950				<i>C. glabrata</i> Cg1				<i>C. glabrata</i> Cg2				<i>C. glabrata</i> Cg3				<i>C. glabrata</i> Cg4				
		<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>SNQ2</i>	<i>PDR1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>SNQ2</i>	<i>PDR1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>SNQ2</i>	<i>PDR1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>SNQ2</i>	<i>PDR1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>SNQ2</i>	<i>PDR1</i>	
1	YPD	1,15	0,35	0,88	1,81	8,54	1,73	1,90	2,31	6,79	0,46	0,78	1,76	1,41	1,11	0,97	1,18	4,66	2,04	2,83	1,96	
2		6,18	1,71	2,50	1,29	4,95	2,17	2,93	1,69	1,45	1,69	1,77	2,15	2,18	2,37	2,32	1,14	2,35	1,22	1,00	1,77	
3		3,26	0,90	1,10	0,87	8,12	1,44	4,07	2,02	19,01	2,34	2,33	1,87	1,17	1,30	1,30	1,00	1,83	1,29	1,43	2,56	
6		1,37	1,03	1,31	0,77	1,95	1,48	1,87	0,66	4,88	1,50	1,27	0,92	0,97	1,16	1,04	0,76	3,31	2,26	1,84	2,42	
8		3,14	2,58	1,42	0,71	1,46	1,64	1,37	0,98	0,80	3,59	2,07	1,17	1,09	1,06	0,86	0,89	2,20	1,63	1,25	2,88	
10		2,79	2,05	2,23	1,57	3,10	2,90	1,74	1,58	5,94	4,00	2,43	1,68	1,06	1,19	1,79	1,07	2,56	1,82	2,20	1,44	
1		RPMI + iFKS													1,02	1,08	0,96	1,04	15,48	11,18	13,82	5,07
2															0,86	0,90	0,60	0,74	6,21	4,36	3,30	2,86
3															0,95	1,22	0,48	0,52	5,26	3,67	2,12	1,15
6															0,62	1,03	0,27	0,57	2,90	2,04	1,60	0,88
8														1,81	2,03	0,59	0,17	4,13	3,71	3,13	1,68	
10														1,75	1,45	0,84	0,26	2,74	2,45	1,84	1,26	



Fortsetzung der Tabelle 10

Tag	Medium	<i>C. glabrata</i> DSM 111950				<i>C. glabrata</i> Cg1				<i>C. glabrata</i> Cg2				<i>C. glabrata</i> Cg3				<i>C. glabrata</i> Cg4			
		CDR1	CDR2	SNQ2	PDR1	CDR1	CDR2	SNQ2	PDR1	CDR1	CDR2	SNQ2	PDR1	CDR1	CDR2	SNQ2	PDR1	CDR1	CDR2	SNQ2	PDR1
1	YNB	12,08	4,20	8,35	2,73	9,06	2,95	5,24	2,96	10,27	4,06	5,37	3,70	1,41	1,15	1,10	1,45	9,78	4,84	4,37	2,82
2		6,30	2,59	2,85	2,72	5,89	3,35	2,60	1,92	3,72	2,07	2,54	3,21	2,30	3,33	1,38	1,05	7,66	3,69	2,88	3,24
3		4,03	2,42	2,09	1,40	1,39	1,13	1,09	1,05	2,67	1,39	1,67	1,59	1,06	1,13	0,84	0,83	6,83	4,82	4,95	3,67
6		1,59	0,98	1,28	1,14	1,17	0,90	1,03	0,66	1,93	0,99	1,83	1,05	4,54	4,40	2,41	0,84	2,16	1,41	1,07	1,08
8		5,16	2,84	2,30	1,79	0,96	0,69	0,74	0,51	2,55	1,79	2,23	1,86	0,88	0,80	0,86	0,91	4,98	3,35	2,70	2,14
10		1,51	1,30	1,50	0,68	0,45	0,36	0,47	0,93	1,55	1,45	1,38	0,85	1,47	1,09	1,48	1,30	1,96	1,23	1,51	2,51



3.3.5. MHK_{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in YPD über 10 Tage

In Tabelle 11 sind die MHK in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol für die über 10 Tage in YPD kultivierten *C. glabrata*-Isolate dargestellt. DSM 11950 veränderte während des Versuchszeitraumes seine MHK_{Flu} nicht. Dieser Stamm blieb unter Doxorubicin-Einfluss gegenüber Fluconazol sensibel. Cg1 wies zu Beginn des Versuchs eine MHK_{Flu} von 8 $\mu\text{g/ml}$ auf. Während die unbehandelte Kontrolle diesen Wert bis zum Ende des Versuches beibehielt und sensibel gegenüber Fluconazol blieb, lag die MHK_{Flu} für die behandelte Probe am 6. Tag bei 32 $\mu\text{g/ml}$. Am 10. Tag erreichte die mit Doxorubicin behandelte Probe eine MHK_{Flu} von 64 $\mu\text{g/ml}$ und war damit resistent gegenüber Fluconazol. Cg2 veränderte unter Doxorubicin-Einfluss die MHK_{Flu} von 4 $\mu\text{g/ml}$ am Tag 0 auf 32 $\mu\text{g/ml}$ am Tag 10. Damit galt dieser Stamm als intermediär resistent gegenüber Fluconazol. Die unbehandelte Kontrolle wies am 10 Tag eine MHK_{Flu} von 4 $\mu\text{g/ml}$ auf. Dieser Wert entsprach der MHK_{Flu} , die zu Beginn des Versuchs gemessen wurde. Die unbehandelte Kontrolle blieb demnach sensibel gegenüber Fluconazol. Die *C. glabrata*-Isolate Cg3 und Cg4 galten mit einer MHK_{Flu} von 32 $\mu\text{g/ml}$ bereits am Tag 0 als intermediär resistent. Diese MHK_{Flu} -Werte veränderten sich während des Versuchszeitraumes um maximal eine Titerstufe. Am 10. Tag entsprachen die MHK_{Flu} aber wieder den Ausgangswerten. Diese Isolate blieben demnach intermediär resistent gegenüber Fluconazol.

Tabelle 11: Dargestellt sind die MHK in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol für die untersuchten *C. glabrata*-Isolate, die in YPD kultiviert wurden. In Klammern sind die MHK_{Flu} der unbehandelten Kontrollen.

Tag	DSM 11950	Cg1	Cg2	Cg3	Cg4
0	4	8	4	32	32
1	4 (4)	8 (4)	8 (4)	32 (32)	16 (16)
2	4 (4)	8 (8)	8 (8)	32 (32)	32 (32)
3	2 (4)	8 (8)	8 (4)	32 (32)	32 (32)
6	4 (4)	32 (8)	16 (4)	32 (32)	32 (32)
8	4 (4)	32 (8)	16 (4)	32 (32)	64 (64)
10	4 (4)	64 (8)	32 (4)	32 (32)	32 (32)

3.3.6. MHK_{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in RPMI + iFKS über 10 Tage

In der Tabelle 12 sind die MHK_{Flu} der in RPMI + iFKS kultivierten *C. glabrata*-Isolate dargestellt. Cg3 wies am 0. Tag eine MHK_{Flu} von 32 $\mu\text{g/ml}$ auf und war somit intermediär resistent. Bis zum 10. Tag sank die MHK_{Flu} der mit Doxorubicin behandelten Probe auf 4 $\mu\text{g/ml}$. Demnach war dieses Isolat sensibel gegenüber Fluconazol. Die MHK_{Flu} der unbehandelten Kontrolle stieg leicht auf 64 $\mu\text{g/ml}$ und war damit resistent. Der Stamm Cg4 veränderte unter dem Einfluss von Doxorubicin seine MHK_{Flu} am 8. Tag um eine Titerstufe. Am 10. Tag wurden wieder die Ausgangs- MHK_{Flu} erreicht.

Tabelle 12: Dargestellt sind die MHK in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol für die untersuchten *C. glabrata*-Isolate, die in RPMI + FKS kultiviert wurden. In Klammern sind die MHK_{Flu} der unbehandelten Kontrollen.

Tag	Cg3	Cg4
0	32	32
1	64 (64)	32 (32)
2	16 (32)	32 (32)
3	32 (64)	32 (32)
6	4 (64)	32 (32)
8	4 (64)	64 (64)
10	4 (64)	32 (32)

3.3.7. MHK_{Flu} -Bestimmung bei Kultivierung in YNB über 10 Tage

Die Tabelle 13 zeigt die MHK_{Flu} bei den über 10 Tage in YNB kultivierten *C. glabrata*-Isolaten. Nur Cg1 wies eine leichte Veränderung der MHK_{Flu} im Verlauf des Experimentes auf. Die MHK_{Flu} sank bei der mit Doxorubicin behandelten Probe von 8 $\mu\text{g/ml}$ auf 2 $\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{Flu} der Kontrolle blieb unverändert. Alle anderen *C. glabrata*-Isolate veränderten ihre MHK_{Flu} um maximal eine Titerstufe.

Tabelle 13: Dargestellt sind die MHK in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol für die untersuchten *C. glabrata*-Isolate, die in YNB kultiviert wurden. In Klammern sind die MHK_{Flu} der unbehandelten Kontrollen.

Tag	DSM 11950	Cg1	Cg2	Cg3	Cg4
0	4	8	8	128	32
1	4 (4)	16 (16)	8 (8)	128 (128)	32 (32)
2	8 (8)	8 (8)	8 (8)	128 (128)	64 (32)
3	8 (8)	2 (8)	8 (8)	128 (128)	64 (64)
6	8 (8)	2 (16)	8 (8)	64 (64)	64 (32)
8	4 (8)	2 (16)	8 (8)	128 (128)	64 (64)
10	8 (8)	2 (8)	8 (8)	64 (64)	32 (32)

3.3.8. Fluconazol-Doxorubicin Chequerboard-Test von *C. glabrata*

In der Abbildung 23 sind die MHK in $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol bei den untersuchten Doxorubicin-Konzentrationen dargestellt. DSM 13268 wies ohne Doxorubicin eine MHK_{Flu} 4 $\mu\text{g/ml}$ auf, die bei einer Doxorubicin-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ auf 8 $\mu\text{g/ml}$ stieg. Cg1 hatte ohne Doxorubicin eine MHK_{Flu} von 8 $\mu\text{g/ml}$. Diese blieb mit Ausnahme einer Steigerung auf 16 $\mu\text{g/ml}$ bei einer Doxorubicin-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mit 8 $\mu\text{g/ml}$ konstant. Cg2 zeigte ohne Doxorubicin eine MHK_{Flu} von 16 $\mu\text{g/ml}$. Diese stieg um eine Titerstufe bei den Doxorubicin-Konzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$. Danach sank sie wieder auf das Ausgangsniveau. Cg3 hatte ohne Doxorubicin eine MHK_{Flu} von 64 $\mu\text{g/ml}$. Diese stieg bei dem Zusatz von Doxorubicin um eine Titerstufe und blieb konstant bis zu einer Doxorubicin-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Die MHK_{Flu} von Cg4 lag ohne Doxorubicin bei 32 $\mu\text{g/ml}$. Diese sank bei einer Doxorubicin-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf 16 $\mu\text{g/ml}$. Bei einer Doxorubicin-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ stieg die MHK_{Flu} von Cg4 auf 64 $\mu\text{g/ml}$. Insgesamt unterschied sich keine MHK_{Flu} der untersuchten *C. glabrata*-Isolate um mehr als eine Titerstufe von der Ausgangs- MHK_{Flu} . DSM 11950, Cg1, Cg2 und Cg4 zeigten bei einer Doxorubicin-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ kein Wachstum mehr, Cg3 bei einer Doxorubicin-Konzentration von 80 $\mu\text{g/ml}$.

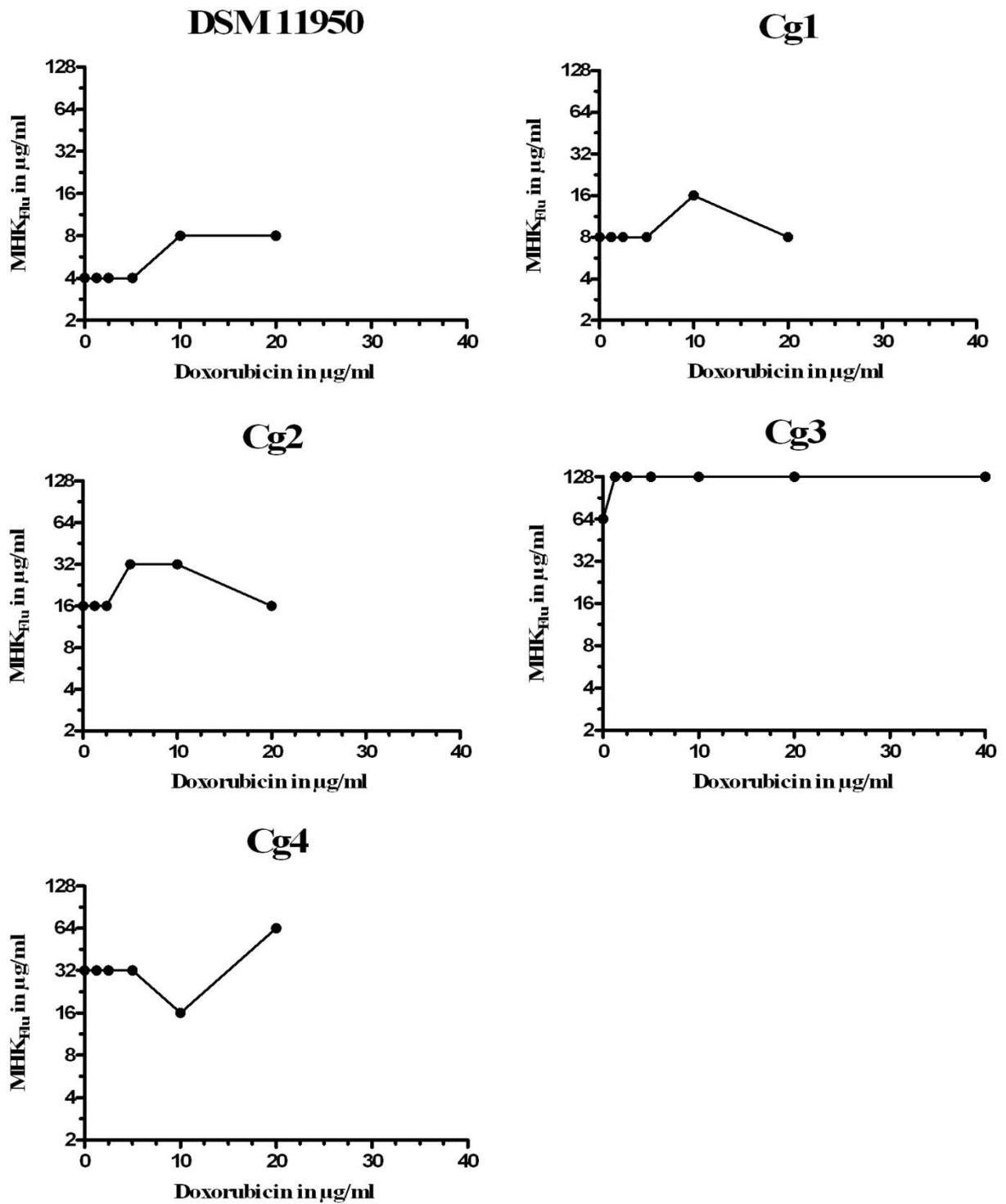


Abbildung 23: Dargestellt sind die MHK in µg/ml Fluconazol bei verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen in µg/ml für die untersuchten *C. glabrata*-Isolate.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Doxorubicin auf die Expression verschiedener Resistenzgene sowie auf die Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata* untersucht.

4.1. Primeretablierung und Effizienzbestimmung

Zur Erstellung einer Genexpressionsanalyse war es notwendig, Primer für die untersuchten Gene zu etablieren. Hierzu wurden verschiedene Kombinationen von *sense*- und *antisense*-Primern in der RT-PCR ausprobiert. Mithilfe der anschließenden Gelelektrophorese konnte überprüft werden, ob die gesuchten Genabschnitte amplifiziert wurden. Zudem konnte eine Kontamination der Proben ausgeschlossen werden. In einem zweiten Schritt wurde die Effizienzbestimmung der besten *sense*- und *antisense*-Primer-Kombination wiederholt. Die mitgeführten Negativkontrollen waren auch hier stets negativ. Die erreichten Effizienzen für die untersuchten Gene genügten mit Werten zwischen 1,84 bis 2,10 den Anforderungen für eine relative Quantifizierung. Besonders die Etablierung von *ACT1* bei *C. dubliniensis* gestaltete sich schwierig. Durch Veränderung der Konzentrationen für den *sense*- und *antisense*-Primer sowie durch Erniedrigung der Temperatur während der Anlagerungs-Phase der RT-PCR, musste von dem PCR-Programm der anderen Gene abgewichen werden. Im Anschluss an die Primeretablierung und Effizienzbestimmung konnte die Genexpressionsanalyse durchgeführt werden. Alle Versuche zur Genexpression wurden doppelt durchgeführt und die erhaltenen C_T -Werte gemittelt. Eine Abweichung der doppelt bestimmten C_T -Werte bis 0,5 wurde toleriert. Lag dieser Wert über 0,5, wurde die Messung wiederholt. Dies war in Ausnahmefällen, in denen die RNA-Menge im Ausgangsansatz sehr gering und demnach die C_T -Werte sehr hoch waren, erforderlich.

4.2. Doxorubicin-Einfluss auf die Expression von Resistenzgenen und auf die Fluconazol-Toleranz bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata*

Ausgehend von den Ergebnissen von Kofla *et al.*, die bei *C. albicans* zeigen konnten, dass Doxorubicin nach 90-minütiger Kultivierung zu einer Expressionssteigerung von *CDR1* und *CDR2* führen kann, wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss von Doxorubicin auf die Resistenzmechanismen bei dem nächsten Verwandten von *C. albicans*, *C. dubliniensis* untersucht (42). Die Kultivierung fand in verschiedenen Medien statt, um den Einfluss des Nahrungsangebots auf die Genexpression zu untersuchen. Zum einen wurde das Vollmedium YPD, zum anderen das Minimalmedium RPMI + iFKS benutzt. Die bei Kofla *et al.* während der Kultivierung verwendete Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml wurde auch bei allen Experimenten in dieser Arbeit verwendet.

Die Kultivierung über 90 min in YPD zeigte eine starke Aktivierung von *CDR2*. Die Expression von *CDR1* wurde nur leicht gesteigert. Die Genexpressionsanalyse des Versuchs über 90 min in RPMI + iFKS zeigte ein ähnliches Bild. Nur war hier die *CDR2*-Expression stärker ausgeprägt. *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* wurden wie in YPD auch in diesem Medium nicht aktiviert.

Festzustellen ist zunächst, dass sowohl in YPD als auch in RPMI + iFKS eine starke *CDR2*-Expressionssteigerung zu sehen war. Dies entspricht den Ergebnissen von Kofla *et al.*, die auch bei *C. albicans* eine Erhöhung der *CDR2*-Expression nach einer 90-minütigen Kultivierung in doxorubicinhaltigem YPD registrierten. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit aber keine deutliche Expressionssteigerung von *CDR1* beobachtet werden. Bei *C. albicans* hingegen konnten Kofla *et al.* zeigen, dass Doxorubicin die Expression von *CDR1* induzieren kann (42). Trotz der engen Verwandtschaft zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* müssen somit Unterschiede in der Regulation des *CDR1*-Gens bestehen. Andererseits konnte entsprechend den Ergebnissen bei *C. albicans* auch in dieser Arbeit keine durch Doxorubicin verursachte Expressionssteigerung von *MDR1* und *ERG11* bei *C. dubliniensis* nachgewiesen werden.

In dem 90-min Versuch war zudem ein Medieffekt zu beobachten. Rodaki *et al.* konnten zeigen, dass eine sehr niedrige Glucose-Konzentration im Vergleich zu einer hohen Glucose-Konzentration in dem Nährmedium, zu einer stärkeren *CDR1*- und *CDR2*-Expression führen kann (79). Die stärkere Aktivierung der *CDR2*-Expression in dem glucoseärmeren Medium RPMI + iFKS wäre so zu erklären.

In der Kultivierung über 10 Tage in YPD konnte ebenfalls eine starke *CDR2*-Expressionssteigerung in allen *C. dubliniensis*-Isolaten beobachtet werden. Eine Expressionssteigerung von *CDR1*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* konnte nicht gezeigt werden. Auch in RPMI + iFKS konnte man eine ähnlich starke *CDR2*-Expressionssteigerung sehen. Der Verlauf der *CDR2*-Expressionssteigerung in RPMI + iFKS unterschied sich jedoch deutlich von dem in YPD. Der Grund für die unterschiedlichen Verläufe der *CDR2*-Expression dürfte in dem Zeitraum zwischen dem 3. und 6. Tag liegen, in dem kein Mediumwechsel stattfand. Das knapper werdende Nahrungsangebot könnte für die in dem Minimalmedium RPMI + iFKS kultivierten *C. dubliniensis*-Isolate zu einem Energiemangel geführt haben, der in der Folge den Anstieg der *CDR2*-Expression begrenzte. Bei den in dem Vollmedium YPD kultivierten Isolaten könnte hingegen der von Rodaki *et al.* beschriebene Effekt zu einer deutlichen Expressionssteigerung am Ende des Zeitraumes zwischen dem 3. und 6. Tag geführt haben (79). Die Glucose-Konzentration wäre demnach in der Kultivierung mit YPD am 6. Tag noch nicht so weit abgesunken, als dass sie eine deutliche *CDR2*-Expressionssteigerung behindert hätte.

Im Checkerboard-Versuch sollte im Anschluss der Einfluss der Doxorubicin-Dosis auf die Fluconazol-Toleranz untersucht werden. Dazu wurden die *C. dubliniensis*-Stämme über 48 h in RPMI-Medium inkubiert, in welches Fluconazol und Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen vorlagen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Steigerung der Doxorubicin-Konzentration die MHK_{Flu} um zwei bis vier Titerstufen gesteigert werden konnte. Drei von vier *C. dubliniensis*-Isolaten konnten maximal eine Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml tolerieren. Ein *C. dubliniensis*-Stamm war noch bei einer Doxorubicin-Konzentration von 40 µg/ml in der Lage zu wachsen. Die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin auf *C. dubliniensis* begrenzte so den dosisabhängigen, synergistischen Effekt auf die Fluconazol-Toleranz. Die zuvor in den 90-min und 10-Tage Versuchen verwendete Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml stellte somit bereits bei drei der vier kultivierten *C. dubliniensis*-Stämme den maximalen Wert dar. Im Vergleich zu *C. utilis* hatte *C. dubliniensis* damit nur eine geringe Doxorubicin-Toleranz. Bei *C. utilis* konnten Keyhani *et al.* zeigen, dass diese *Candida*-Art eine Doxorubicin-Konzentration von 200 µg/ml toleriert. Bei dieser Konzentration waren nur 58 % der *C. utilis*-Zellen apoptotisch oder nekrotisch (40).

Im Rahmen des 10-Tage Versuchs wurden zudem die MHK_{Flu} erstellt. Dabei wurde das CLSI-Protokoll verwendet. Es zeigte sich, dass alle *C. dubliniensis*-Isolate sowohl in YPD als auch in RPMI + iFKS sensibel waren und während des 10-Tage Versuchs ihre MHK_{Flu} nur

um maximal eine Titerstufe veränderten. Nach dem CLSI-Protokoll wurden die Proben jedoch über 48 h in RPMI ohne Doxorubicin inkubiert, bevor die MHK_{Flu} abgelesen werden konnte. Ein möglicher reversibler Effekt von Doxorubicin auf die MHK_{Flu} , der nach weniger als 48 h wieder erlöscht, wäre demnach nicht zu erkennen gewesen. Aus diesem Grund wurde abweichend vom CLSI-Protokoll eine MHK_{Flu}^{mod} erstellt, bei der während der 48-stündigen Inkubierung in RPMI eine Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml, die der Konzentration im 10-Tage Versuch entsprach, wieder hergestellt wurde. Die MHK_{Flu}^{mod} wurde für die während des 10-Tage Versuchs mit Doxorubicin behandelten Proben sowie für die unbehandelten Kontrollen angefertigt. Sie lag für alle untersuchten Proben eine bis vier Titerstufen über den nach dem CLSI-Protokoll erstellten MHK_{Flu} .

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Kofla *et al.* zu *C. albicans*. Es konnte bei *C. albicans* gezeigt werden, dass bei einer Doxorubicin-Konzentration von 20 µg/ml die Fluconazol-Toleranz um zwei bis drei Titerstufen im Vergleich zu einer Kultivierung in doxorubicinfreiem Medium gesteigert war (42). Die in dieser Arbeit nach dem CLSI-Protokoll erstellten MHK_{Flu} können durch die 48-stündige Kultivierung in RPMI in diesem Zusammenhang als Kultivierung in doxorubicinfreiem Medium betrachtet werden. Die 48-stündige Kultivierung bei der Erstellung der MHK_{Flu}^{mod} wurde hingegen in RPMI + 20 µg/ml Doxorubicin durchgeführt.

Auch mit dem Chequerboard-Versuch passen die Ergebnisse der MHK_{Flu}^{mod} -Bestimmung gut überein. Wie oben bereits erwähnt, konnte im Chequerboard-Versuch die Fluconazol-Toleranz der *C. dubliniensis*-Isolate um zwei bis vier Titerstufen erhöht werden, indem die Doxorubicin-Konzentration von 0 µg/ml auf 20-40 µg/ml stieg.

Die Experimente zur Bestimmung MHK_{Flu} bzw. MHK_{Flu}^{mod} lassen auch andere Schlussfolgerungen zu. So muss es sich bei der doxorubicininduzierten Erhöhung der Fluconazol-Toleranz um einen reversiblen Effekt gehandelt haben, da die während des 10-Tage Versuchs durch Doxorubicin ausgelöste Erhöhung der Fluconazol-Toleranz, die durch die Erstellung der MHK_{Flu}^{mod} gezeigt werden konnte, im Rahmen der nach dem CLSI-Protokoll erstellten MHK_{Flu} , wieder verloren ging. Die Erhöhung der MHK_{Flu}^{mod} war somit nach Doxorubicin-Exposition zeitlich begrenzt bzw. reversibel.

Zudem zeigte sich, dass sowohl die mit Doxorubicin behandelten Proben, als auch die während des 10-Tage-Versuchs unbehandelten Kontrollen eine um den gleichen Faktor im Vergleich zur MHK_{Flu} erhöhte MHK_{Flu}^{mod} aufwiesen. Eine mehr als 48-stündige Dauer der Doxorubicin-Exposition hatte demnach keine additive Wirkung auf die Fluconazol-Toleranz, da das Wachstum in doxorubicinhaltigem Medium zuvor im 10-Tage Versuch keinen Effekt

auf die MHK_{Flu}^{mod} hatte. Wie lange jedoch bei *C. dubliniensis* eine Kultivierung in doxorubicinhaltigem Medium nötig ist, um einen Anstieg der Fluconazol-Toleranz zu bewirken, konnte nicht geklärt werden, da die Proben im Rahmen der MHK_{Flu}^{mod} -Bestimmung über 48 h inkubiert werden mussten, um ein ausreichendes Wachstum der *C. dubliniensis*-Stämme und damit die Auswertung der MHK_{Flu}^{mod} -Werte zu garantieren.

Dennoch ist es anhand dieser Ergebnisse fraglich, inwieweit in diesem Fall die MHK_{Flu} -Werte, die mithilfe des CLSI-Protokolls erstellt wurden, ein reales Bild der Resistenzlage der untersuchten *C. dubliniensis*-Stämme abbildeten. Zwar waren auch die MHK_{Flu}^{mod} ohne Ausnahme als sensibel einzustufen, jedoch könnten die Abweichungen von bis zu vier Titerstufen zu den MHK_{Flu} -Werten, die nach dem in der klinischen Praxis häufig verwendeten CLSI-Protokoll erstellt wurden, im Hinblick auf die Dauer oder die Dosis einer antimykotischen Therapie, eine Rolle spielen.

Fraglich blieb zudem, ob die durch Doxorubicin ausgelöste Erhöhung der MHK_{Flu}^{mod} um eine bis vier Titerstufen durch die in den 90-min- bzw. 10-Tage-Versuchen beobachtete *CDR2*-Expressionssteigerung verursacht wurde. Obwohl diese Annahme wahrscheinlich ist, würde eine eindeutige Antwort eine $\Delta CDR2$ -Mutante von *C. dubliniensis* bringen. Sollte diese keine Erhöhung der Fluconazol-Toleranz infolge einer Konzentrationssteigerung von Doxorubicin im Medium zeigen, wäre die Hypothese bestätigt.

Sicher ist jedoch, dass die in den Experimenten beobachtete Überexpression von *CDR2*, selbst unter der Voraussetzung, dass Fluconazol ein Substrat von Cdr2p ist, wenig wahrscheinlich der Grund für eine Resistenz gegenüber Fluconazol bei *C. dubliniensis* ist. Dies stimmt überein mit den Beobachtungen von Moran *et al.*, die v.a. eine Überexpression von *MDR1* als Ursache für eine Fluconazol-Resistenz sehen (60,61). *MDR1* wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen jedoch nicht überexprimiert.

Im Anschluss an die Versuche mit *C. dubliniensis* wurden die Experimente in gleicher Abfolge auch mit *C. glabrata* durchgeführt. Die Untersuchung des Einflusses von Doxorubicin auf das Resistenzverhalten bei *C. glabrata* war wichtig, da *C. glabrata* nur dosisabhängig sensibel auf Fluconazol ist, was besonders bei onkologischen Patienten, die aufgrund ihres geschwächten Immunstatus eine prophylaktische Therapie mit Fluconazol bekommen, von Bedeutung ist. *C. glabrata* ist eng verwandt mit *S. cerevisiae*. Mit *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist *C. glabrata* nur entfernt verwandt, was bereits vor der Fertigstellung der Experimente mit *C. glabrata* Unterschiede zu *C. dubliniensis* vermuten ließ.

So konnte im 90-min Versuch bei *C. glabrata*, im Gegensatz zu *C. dubliniensis*, keine Expressionssteigerung für eines der untersuchten Resistenzgene beobachtet werden. Erst in dem 10-Tage-Versuch konnte eine Aktivierung der Genexpression gezeigt werden. Jedoch stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, die fluconazolsensiblen *C. glabrata*-Isolate DSM 11950, Cg1 und Cg2 in doxorubicinhaltigem RPMI + iFKS zu kultivieren. Die fluconazolresistenten Stämmen Cg3 und Cg4 konnten in diesem Medium kultiviert werden. Um dennoch die Genexpression bei Wachstum in einem Minimalmedium zu untersuchen, wurden die 10-Tage Versuche zusätzlich in YNB durchgeführt. Sowohl in YPD als auch in YNB konnte, mit Ausnahme von Cg3, bei allen *C. glabrata*-Isolaten eine gesteigerte Genexpression beobachtet werden. Diese fiel besonders stark für *CDR1* aus. Die Expression von *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* war bei allen Isolaten außer Cg3 leicht gesteigert. Die Höhe des Expressionsanstiegs lag in YPD und YNB auf dem gleichen Niveau. Ein Unterschied, zwischen dem Wachstum in einem Minimal- und Vollmedium in Hinblick auf die Stärke der Genexpression, konnte somit wie bei *C. dubliniensis* nicht beobachtet werden. Jedoch variierte der Verlauf der Expressionssteigerung in YPD und YNB erheblich. Während in YPD die Expressionssteigerung der untersuchten Gene bis zum 10. Tag nahezu konstant blieb, fiel sie in YNB bis zum 10. Tag stark ab. Vermutlich war das Nahrungsangebot in YNB für *C. glabrata* nicht ausreichend, um dauerhaft die energieaufwendigen Mechanismen zur Reparatur der durch Doxorubicin entstandenen Schäden aufrechterhalten zu können, so dass in der Folge das Expressionsniveau der untersuchten Gene sank. Diese Vermutung wird erhärtet durch die Kultivierung in dem Minimalmedium RPMI + iFKS. Hier zeigten die mit Doxorubicin behandelten Proben der *C. glabrata*-Isolate DSM 11950, Cg1 und Cg2 vom ersten Tag an kein ausreichendes Wachstum. Die mitgeführten unbehandelten Kontrollen dieser Isolate zeigten hingegen in RPMI + iFKS ein schwaches Wachstum. Das Nahrungsangebot in diesem Medium war für die oben genannten Isolate demnach zu gering. Die fluconazolresistenten Isolate Cg3 und Cg4 ließen sich in RPMI + iFKS über 10 Tage kultivieren. Cg4 wies jedoch ebenfalls bis zum 10. Tag eine sinkende Expressionsstärke der untersuchten Gene auf. Cg3 zeigte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg eine durch Doxorubicin leicht abgeschwächte Genexpression.

Die MHK_{Flu} , die während der 10-Tage Versuche in den unterschiedlichen Medien erstellt wurden, variierten erheblich. In YPD wurden die Stämme Cg1 und Cg2 durch das Wachstum in doxorubicinhaltigem Medium fluconazolresistent, bzw. fluconazolintermediär resistent. Die MHK_{Flu} -Werte von DSM 11950, Cg3 und Cg4 hingegen blieben sensibel bzw. intermediär resistent. Der Grund für die Resistenzentwicklung der Isolate Cg1 und Cg2

konnte in sich an dieser Arbeit anschließenden Experimenten durch Schulz *et al.* (*unveröffentlicht*) näher bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin zu einer allmählichen Selektion von *petite mutants* bei *C. glabrata* führt, die sowohl gegenüber Doxorubicin, als auch gegenüber Fluconazol eine hohe Toleranz aufweisen. Buschini *et al.* konnten diesen Effekt von Doxorubicin bereits bei *S. cerevisiae* beobachten (9). Bis in dieser Arbeit der Prozess der Selektion von *petite mutants* Auswirkungen auf die MHK_{Flu} der untersuchten Stämme hatte, war ein längerer Zeitraum nötig. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass *petite mutants* über einen eingeschränkten Energiestoffwechsel verfügen, der ihnen nur ein langsames Wachstum ermöglicht. Bei Cg1 und Cg2 konnte so erst ab dem 6. Tag eine Steigerung der MHK_{Flu} -Werte beobachtet werden. Bei DSM 11950 konnte diese nicht gesehen werden. Vermutlich war die Dauer des Doxorubicin-Einflusses bei diesem Stamm nicht ausreichend. Schulz *et al.* (*unveröffentlicht*) und Brun *et al.* konnten zudem zeigen, dass die durch Doxorubicin selektionierten *petite mutants* *CDR1* überexprimieren (7). Dies korreliert gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da auch hier eine *CDR1*-Überexpression bei den untersuchten *C. glabrata*-Isolaten registriert werden konnte. Nur bei dem fluconazolresistenten Stamm Cg3 konnte in YPD keine Veränderung in der Genexpression durch den Einfluss von Doxorubicin festgestellt werden. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass es sich bei Cg3 bereits um einen *petite mutant* handelte. Durch den Einfluss von Doxorubicin wäre somit keine weitere Selektion von *petite mutants* mehr möglich gewesen. Dies würde die ausbleibende *CDR1*-Expressionssteigerung der mit Doxorubicin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dieses Stamms erklären.

In YNB blieben die MHK_{Flu} der untersuchten *C. glabrata*-Isolate weitgehend stabil. Das Nahrungsangebot war hier vermutlich zu knapp, als dass sich die in ihrer Energiegewinnung eingeschränkten *petite mutants* in ausreichendem Maße vermehren konnten.

In RPMI + iFKS konnte ein anderer Effekt beobachtet werden. Hier war das Nahrungsangebot stark herabgesetzt. Wie bereits oben beschrieben, konnten die Isolate DSM 11950, Cg1 und Cg2 in diesem Medium bei Zugabe von Doxorubicin nicht wachsen. Der zytotoxische Effekt von Doxorubicin schien hier zu stark zu sein. Der Stamm Cg3 war zwar in der Lage zu wachsen, die MHK_{Flu} der mit Doxorubicin behandelten Probe sank jedoch. Zusammen mit der in diesem Medium abgeschwächten Genexpression von Cg3, bestärkt dies die oben erwähnte Vermutung, dass es sich bei diesem Stamm um einen *petite mutant* handelt. Das ohnehin niedrige Nahrungsangebot in RPMI + iFKS in Verbindung mit dem eingeschränkten Metabolismus der *petite mutants* könnten demnach die abgeschwächte Genexpression sowie das Absinken der MHK_{Flu} erklären. Die mit Doxorubicin behandelten

Proben und die unbehandelten Kontrollen des Stamms Cg4 veränderten in RPMI + iFKS die MHK_{Flu} nicht. Welcher Mechanismus diesen Stamm trotz des Nahrungsmangels sowohl gegen Fluconazol als auch gegen Doxorubicin resistent machte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Im Chequerboard-Versuch veränderte sich die MHK_{Flu} bei steigenden Doxorubicin-Konzentrationen nicht. Die maximal tolerierten Doxorubicin-Konzentrationen lagen bei den *C. glabrata*-Isolaten DSM 11950, Cg1, Cg2 und Cg4 bei 20 µg/ml. Cg3 war in Lage, noch Doxorubicin-Konzentrationen von 40 µg/ml zu tolerieren, was zu der Vermutung passt, dass es sich bei diesem Isolat um einen *petite mutant* handelt. Kule *et al.* konnten bereits bei *S. cerevisiae* zeigen, dass *petite mutants* eine erhöhte Doxorubicin-Toleranz aufweisen (46).

Ein synergistischer, schnell wirksamer Effekt von Doxorubicin auf die Fluconazol-Toleranz wie bei *C. dubliniensis* konnte bei *C. glabrata* somit nicht beobachtet werden. Vielmehr wurden durch den Einfluss von Doxorubicin *petite mutants* selektioniert. Die Selektion dieser Mutanten schien jedoch in starkem Maße vom Nahrungsangebot abhängig zu sein. War dieses ungenügend, überwiegte im 10-Tage Versuch die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin. In dem Vollmedium YPD konnten jedoch *petite mutants* entstehen, die sowohl gegenüber Fluconazol als auch gegenüber Doxorubicin eine hohe Toleranz zeigten.

Die Fähigkeit von Doxorubicin beim Menschen, durch Initiierung einer Überexpression von ABC-Transportergenen wie *hsMDR1* die Krebszelle resistent gegenüber verschiedene Pharmaka werden zu lassen, scheint demnach auch bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten *Candida spp.* zu wirken (30). Zwar unterscheiden sich wie oben beschrieben die Mechanismen der Resistenzbildung bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata* grundsätzlich. Dennoch ist bei beiden *Candida spp.* infolge der Doxorubicin-Wirkung eine Steigerung der Fluconazol-Toleranz, die mit einer verstärkten Expression von ABC-Transportern assoziiert ist, zu sehen.

4.3. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten belegen, dass Doxorubicin bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata* einen Einfluss auf die Expression ausgewählter Resistenzgene sowie auf die Sensibilität gegenüber Fluconazol haben kann. Jedoch gibt es noch verschiedene Punkte, die weiter erforscht werden sollten. So konnte in den vorangegangenen Experimenten zu *C. dubliniensis* nicht eindeutig bewiesen werden, dass die beobachtete Überexpression von *CDR2* für die MHK_{Flu} -Erhöhung verantwortlich war. Zur Klärung dieser Frage wäre es denkbar, eine $\Delta CDR2$ -Mutante zu verwenden. Falls ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von *CDR2* und der MHK_{Flu} -Erhöhung bestünde, sollte ein Konzentrationsanstieg von Doxorubicin keine Erhöhung der Fluconazol-Toleranz in der $\Delta CDR2$ -Mutante nach sich ziehen. Zudem konnte bei *C. dubliniensis* gezeigt werden, dass es durch den Einfluss von Doxorubicin innerhalb von 48 h zu einem Anstieg der Fluconazol-Toleranz um mehrere Titerstufen kommt. Der genaue Zeitraum, der nötig ist, um diesen Effekt hervorzurufen, bleibt offen.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zu dem durch Doxorubicin hervorgerufenen Anstieg der Fluconazol-Toleranz bei *C. glabrata* sind bereits als Grundlage weiterer Forschungen in der Arbeitsgruppe verwendet worden. Dennoch gibt es auch hier einzelne Punkte, die einer weiteren Abklärung bedürfen. So ist es bei dem in dieser Arbeit verwendeten fluconazolresistenten Stamm Cg3 wahrscheinlich, dass es sich um einen *petite mutant* handelt. Dies sollte aber in weiteren Experimenten belegt werden. Generell scheint es wichtig, den Stellenwert von *petite mutants* in der Entstehung von Fluconazol-Resistenzen bei *C. glabrata* zu klären. Hierfür wäre es denkbar, Isolate von onkologischen Patienten, die mit Doxorubicin behandelt wurden und an einer *C. glabrata*-Infektion erkrankt sind, im Verlauf der Erkrankung auf das Vorhandensein von *petite mutants* in Verbindung mit der entsprechenden MHK_{Flu} zu untersuchen. Zudem sollte die in dieser Arbeit gezeigte Fähigkeit von Doxorubicin, die Toleranz der beiden untersuchten *Candida spp.* gegenüber Fluconazol zu erhöhen, auch für andere Antimykotika aus anderen Antimykotika-Klassen untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten auch weitere Zytostatika wie Daunorubicin, Vincristin, Vinblastin oder Etoposid auf mögliche Wechselwirkungen, die das Resistenzverhalten von *Candida spp.* beeinflussen, untersucht werden. Zwar gibt es hier z.B. bei Cyclophosphamid bereits einzelne Erkenntnisse. Aber dennoch muss, vor allem im Hinblick auf die möglichen Folgen einer invasiven *Candida*-Infektion bei onkologischen Patienten, an dieser Stelle intensiv weiter geforscht werden.

5. Zusammenfassung

Candida spp. stellen durch die hohe Prävalenz von immunsupprimierten Patienten ein zunehmendes Problem bei nosokomialen Infektionen dar. Die häufigste *Candida spp.* ist *C. albicans*. Jedoch sind im verstärkten Maße auch sogenannte Nicht-*C. albicans spp.*, wie *C. glabrata* und *C. dubliniensis*, in klinischen Proben zu finden (80). *Candida spp.* sind in der Lage, schwerwiegende systemische Infektionen und Erkrankungen auszulösen, die durch die Entwicklung von Resistenzen kompliziert werden können. Gerade Patienten in der Hämatologie/Onkologie sind dabei aufgrund ihres herabgesetzten Immunstatus einem besonderen Risiko ausgesetzt, eine Infektion mit *Candida spp.* zu entwickeln. Wechselwirkungen zwischen Chemotherapeutika und dem Resistenzverhalten von *Candida spp.* geraten in zunehmendem Maße in den Blickpunkt wissenschaftlicher Fragestellungen. Für Doxorubicin, welches ein in der Hämatologie/Onkologie häufig eingesetztes Chemotherapeutikum ist, konnte bereits durch Kofla *et al.* gezeigt werden, dass es bei *C. albicans* zu einer Aktivierung von Resistenzmechanismen und einer Zunahme der Fluconazol-Toleranz führen kann (42).

Aufgabe dieser Arbeit war es, diesen Zusammenhang auch für die Nicht-*C. albicans spp.* *C. dubliniensis* und *C. glabrata* zu untersuchen. *C. glabrata* ist eine der wichtigsten Nicht-*C. albicans spp.* und ist nach *C. albicans* am zweithäufigsten in klinischen Proben zu finden (50). *C. dubliniensis* ist sehr nah mit *C. albicans* verwandt und wurde aufgrund der Ähnlichkeit erst 1995 klassifiziert (102). Mehrere Isolate der beiden *Candida spp.* wurden in doxorubicinhaltigem und doxorubicinfreiem Minimal- bzw. Vollmedium kultiviert. Es wurden Kurzzeitversuche über 90 min sowie Langzeitversuche über 10 Tage durchgeführt. Im Verlauf dieser Experimente wurde in regelmäßigen Abständen die Expression ausgewählter Resistenzgene untersucht und die MHK für Fluconazol bestimmt. Im Anschluss daran wurde in einem Chequerboard-Versuch das Wachstum der *C. dubliniensis*- und *C. glabrata*-Isolate in einem Medium untersucht, welches sowohl Doxorubicin als auch Fluconazol in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt.

Bei *C. dubliniensis* wurde durch den Einfluss von Doxorubicin im Kurzzeit- und im Langzeitversuch das ABC-Transportergen *CDR2* überexprimiert. Eine durch Doxorubicin induzierte Aktivierung der Resistenzgene *CDR1*, *MDR1*, *ERG3* und *ERG11* konnte nicht beobachtet werden. Die Wahl des verwendeten Mediums spielte in Bezug auf die Stärke der Genexpression bei *C. dubliniensis* eine untergeordnete Rolle. Im Rahmen der MHK-Bestimmung sowie des Chequerboard-Versuchs kam es, abhängig von der Doxorubicin-

Konzentration, zu einer um bis zu vier Titerstufen gesteigerten MHK für Fluconazol. Dieser Anstieg der Fluconazol-Toleranz von *C. dubliniensis* konnte bereits nach einer 48-stündigen Kultivierung in doxorubicinhaltigen Medium beobachtet werden und war nach einer Kultivierung in doxorubicinfreiem Medium reversibel. Im Vergleich zu *C. albicans* zeigte *C. dubliniensis* damit, sowohl bei der Aktivierung des *CDR2*-Gens als auch bei der Steigerung der Fluconazol-Toleranz, einen ähnlichen Effekt auf die Kultivierung in doxorubicinhaltigem Medium.

Bei *C. glabrata* konnte eine durch Doxorubicin induzierte Überexpression des ABC-Transportergens *CDR1* sowie eine leicht gesteigerte Expression von *CDR2*, *SNQ2* und *PDR1* beobachtet werden. Im Gegensatz zu *C. dubliniensis* war die Aktivierung der untersuchten Gene erst im Langzeitversuch festzustellen. Das Medium hatte bei *C. glabrata* im Vergleich zu *C. dubliniensis* einen stärkeren Einfluss auf die Genexpression. Während es bei der Kultivierung in einem Vollmedium zu einer konstant hohen Genexpression kam, sank diese in einem Minimalmedium im Verlauf des Langzeitversuchs ab. Zudem war Doxorubicin bei einigen *C. glabrata*-Isolaten in der Lage, eine Fluconazol-Resistenz zu induzieren. Anders als bei *C. dubliniensis*, wo eine erhöhte Fluconazol-Toleranz bereits nach 48 h beobachtet werden konnte, manifestierte sich diese bei *C. glabrata* erst nach sechs bis acht Tagen. Vermutlich war dieser Prozess bei *C. glabrata* mit dem Auftreten von *petite mutants* assoziiert. Diese atmungsdefizienten Mutanten treten auch bei *Saccharomyces cerevisiae* auf. Bei diesem nahen Verwandten von *C. glabrata* konnte bereits durch Buschini *et al.* gezeigt werden, dass Doxorubicin in der Lage ist, *petite mutants* zu selektionieren (9). Die Mechanismen der Resistenzentstehung unterschieden sich demnach in den untersuchten *Candida spp.* grundsätzlich, wobei sowohl bei *C. dubliniensis* als auch bei *C. glabrata* eine Assoziation zwischen der Erhöhung der Fluconazol-Toleranz und der Überexpression von ABC-Transportergenen bestand.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind potenziell von klinischer Bedeutung, da sie einen möglichen Erklärungsansatz für das Auftreten von Antimykotika-Resistenzen bei *C. dubliniensis* und *C. glabrata* bei onkologischen Patienten liefern. Sie könnten in diesem Zusammenhang helfen, durch das Vorbeugen einer Resistenzentwicklung, die hohe Letalität von *Candida*-Infektionen in diesem besonders gefährdeten Patientenkreis zu senken.

6. Literaturverzeichnis

1. **Aoki, S. and S. Ito-Kuwa.** 1987. Induction of petite mutation with acriflavine and elevated temperature in *Candida albicans*. *J.Med.Vet.Mycol.* **25**:269-277.
2. **Barbaro, G., G. Barbarini, and L. G. Di.** 1996. Fluconazole vs itraconazole-flucytosine association in the treatment of esophageal candidiasis in AIDS patients. A double-blind, multicenter placebo-controlled study. The *Candida Esophagitis Multicenter Italian Study (CEMIS) Group*. *Chest* **110**:1507-1514.
3. **Blumberg, H. M., W. R. Jarvis, J. M. Soucie, et al.** 2001. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin.Infect.Dis.* **33**:177-186.
4. **Borst, P. and R. O. Elferink.** 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu.Rev.Biochem.* **71**:537-592.
5. **Bouza, E. and P. Munoz.** 2008. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int.J.Antimicrob.Agents* **32 Suppl 2**:S87-S91.
6. **Brockert, P. J., S. A. Lachke, T. Srikantha, et al.** 2003. Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect.Immun.* **71**:7109-7118.
7. **Brun, S., T. Berges, P. Poupard, et al.** 2004. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1788-1796.
8. **Budtz-Jorgensen, E., A. Stenderup, and M. Grabowski.** 1975. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent.Oral Epidemiol.* **3**:115-119.
9. **Buschini, A., P. Poli, and C. Rossi.** 2003. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis* **18**:25-36.
10. **Calandra, T., J. Bille, R. Schneider, F. Mosimann, and P. Francioli.** 1989. Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients. *Lancet* **2**:1437-1440.
11. **Carter, S. K.** 1975. Adriamycin-a review. *J Natl.Cancer Inst.* **55**:1265-1274.
12. **Chau, A. S., M. Gurnani, R. Hawkinson, et al.** 2005. Inactivation of sterol Delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:3646-3651.
13. **Chen, K. Y., S. C. Ko, P. R. Hsueh, K. T. Luh, and P. C. Yang.** 2001. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest* **120**:177-184.

14. **Cornely, O. A., J. Maertens, D. J. Winston, et al.** 2007. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N.Engl.J.Med.* **356**:348-359.
15. **Decottignies, A., L. Lambert, P. Catty, et al.** 1995. Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **270**:18150-18157.
16. **Dessypris, E. N., D. E. Brenner, M. R. Baer, and K. R. Hande.** 1988. Uptake and intracellular distribution of doxorubicin metabolites in B-lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **48**:503-506.
17. **Douglas, L. J.** 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev.Iberoam.Micol.* **19**:139-143.
18. **Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, et al.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**:35-44.
19. **Dupont, B. F., O. Lortholary, L. Ostrosky-Zeichner, F. Stucker, and V. Yeldandi.** 2009. Treatment of candidemia and invasive candidiasis in the intensive care unit: post hoc analysis of a randomized, controlled trial comparing micafungin and liposomal amphotericin B. *Crit Care* **13**:R159.
20. **Epstein, J. B., P. J. Hancock, and S. Nantel.** 2003. Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: an outcome-based analysis. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* **96**:154-163.
21. **Falcone, M., N. Barzagli, G. Carosi, et al.** 2009. *Candida* infective endocarditis: report of 15 cases from a prospective multicenter study. *Medicine (Baltimore)* **88**:160-168.
22. **Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel.** 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin.Microbiol.Rev.* **12**:80-96.
23. **Gaitan-Cepeda, L. A., M. Martinez-Gonzalez, and A. Ceballos-Salobrena.** 2005. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. *AIDS Patient.Care STDS.* **19**:70-77.
24. **Gavelova, M., J. Hladikova, L. Vildova, et al.** 2008. Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Chem.Biol.Interact.* **176**:9-18.
25. **Geber, A., C. A. Hitchcock, J. E. Swartz, et al.** 1995. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:2708-2717.
26. **Ghannoum, M. A. and L. B. Rice.** 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* **12**:501-517.

27. **Gilfillan, G. D., D. J. Sullivan, K. Haynes, et al.** 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144** (Pt 4):829-838.
28. **Girish Kumar, C. P., T. Menon, D. Prabu, and B. Nandhakumar.** 2007. Chlamydosporulation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* on mustard agar. *Mycoses* **50**:71-73.
29. **Goodman, J. L., D. J. Winston, R. A. Greenfield, et al.** 1992. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* **326**:845-851.
30. **Gottesman, M. M., T. Fojo, and S. E. Bates.** 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat.Rev.Cancer* **2**:48-58.
31. **Grubb, S. E., C. Murdoch, P. E. Sudbery, et al.** 2008. *Candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Infect.Immun.* **76**:4370-4377.
32. **Gupta, N., A. Haque, A. A. Lattif, et al.** 2004. Epidemiology and molecular typing of *Candida* isolates from burn patients. *Mycopathologia* **158**:397-405.
33. **Hannula, J., M. Saarela, B. Dogan, et al.** 2000. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol.Immunol.* **15**:238-244.
34. **Henry, K. W., J. T. Nickels, and T. D. Edlind.** 2000. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:2693-2700.
35. **Imam, N., C. C. Carpenter, K. H. Mayer, et al.** 1990. Hierarchical pattern of mucosal candida infections in HIV-seropositive women. *Am.J.Med.* **89**:142-146.
36. **Kannangara, S., D. Shindler, D. Y. Kunimoto, B. Sell, and J. A. DeSimone.** 2007. Candidemia complicated by endophthalmitis: a prospective analysis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **26**:839-841.
37. **Kato, M., M. Ozeki, A. Kikuchi, and T. Kanbe.** 2001. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene* **272**:275-281.
38. **Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic, and B. P. Cormack.** 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr.Opin.Microbiol.* **8**:378-384.
39. **Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, et al.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta^{5,6}-desaturation. *FEBS Lett.* **400**:80-82.
40. **Keyhani, E. and J. Keyhani.** 2004. Plasma membrane alteration is an early signaling event in doxorubicin-induced apoptosis in the yeast *Candida utilis*. *Ann.N Y.Acad.Sci.* **1030**:369-376.

41. **Khan, F. A., D. Slain, and R. A. Khakoo.** 2007. Candida endophthalmitis: focus on current and future antifungal treatment options. *Pharmacotherapy* **27**:1711-1721.
42. **Kofla, G., V. Turner, B. Schulz, et al.** 2011. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Med.Mycol.* **49**:132-142.
43. **Kohli, A., Smriti, K. Mukhopadhyay, A. Rattan, and R. Prasad.** 2002. In vitro low-level resistance to azoles in *Candida albicans* is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:1046-1052.
44. **Kolaczowska, A. and A. Goffeau.** 1999. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist.Updat.* **2**:403-414.
45. **Kremery, V. and A. J. Barnes.** 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J.Hosp.Infect.* **50**:243-260.
46. **Kule, C., O. Ondrejickova, and K. Verner.** 1994. Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast. *Mol.Pharmacol.* **46**:1234-1240.
47. **Kullberg, B. J., J. D. Sobel, M. Ruhnke, et al.** 2005. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **366**:1435-1442.
48. **Larsen, B., S. Anderson, A. Brockman, M. Essmann, and M. Schmidt.** 2006. Key physiological differences in *Candida albicans* CDR1 induction by steroid hormones and antifungal drugs. *Yeast* **23**:795-802.
49. **Leibovitz, E.** 2002. Neonatal candidosis: clinical picture, management controversies and consensus, and new therapeutic options. *J.Antimicrob.Chemother.* **49 Suppl 1**:69-73.
50. **Li, L., S. Redding, and A. Dongari-Bagtzoglou.** 2007. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J.Dent.Res.* **86**:204-215.
51. **Loffler, J., S. L. Kelly, H. Hebart, et al.** 1997. Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol.Lett.* **151**:263-268.
52. **Lupetti, A., R. Danesi, M. Campa, T. M. Del, and S. Kelly.** 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol.Med.* **8**:76-81.
53. **Marichal, P., L. Koymans, S. Willemsens, et al.** 1999. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145 (Pt 10)**:2701-2713.
54. **Marichal, P., B. H. Vanden, F. C. Odds, et al.** 1997. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:2229-2237.

55. **Marr, K. A., C. N. Lyons, T. R. Rustad, R. A. Bowden, and T. C. White.** 1998. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:2584-2589.
56. **Matuszkiewicz-Rowinska, J.** 2009. Update on fungal peritonitis and its treatment. *Perit.Dial.Int.* **29 Suppl 2**:S161-S165.
57. **McCool, L., H. Mai, M. Essmann, and B. Larsen.** 2008. Tetracycline effects on *Candida albicans* virulence factors. *Infect.Dis.Obstet.Gynecol.* **2008**:493508.
58. **Mimnaugh, E. G., M. A. Trush, M. Bhatnagar, and T. E. Gram.** 1985. Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem.Pharmacol.* **34**:847-856.
59. **Moen, M. D., K. A. Lyseng-Williamson, and L. J. Scott.** 2009. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* **69**:361-392.
60. **Moran, G., D. Sullivan, J. Morschhauser, and D. Coleman.** 2002. The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:2829-2841.
61. **Moran, G. P., D. Sanglard, S. M. Donnelly, et al.** 1998. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:1819-1830.
62. **Morschhauser, J., K. S. Barker, T. T. Liu, et al.** 2007. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS.Pathog.* **3**:e164.
63. **Mukhopadhyay, K., T. Prasad, P. Saini, et al.** 2004. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1778-1787.
64. **Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader, and B. Hube.** 2004. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol.* **6**:915-926.
65. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M27-A .
66. **Nielsen, K. and J. Heitman.** 2007. Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv.Genet.* **57**:143-173.
67. **O'Keefe, J., S. Doyle, and K. Kavanagh.** 2003. Exposure of the yeast *Candida albicans* to the anti-neoplastic agent adriamycin increases the tolerance to amphotericin B. *J.Pharm.Pharmacol.* **55**:1629-1633.
68. **Onyewu, C., J. R. Blankenship, P. M. Del, and J. Heitman.** 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors

- against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:956-964.
69. **Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, et al.** 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2676-2684.
70. **Pfaller, M. A. and D. J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133-163.
71. **Pfaller, M. A., R. N. Jones, S. A. Messer, M. B. Edmond, and R. P. Wenzel.** 1998. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**:121-129.
72. **Piccart-Gebhart, M. J.** 2006. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **354**:2177-2179.
73. **Prasad, R., W. P. De, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**:320-329.
74. **Prasad, R. and K. Kapoor.** 2005. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* **242**:215-248.
75. **Rabbani, A., R. M. Finn, and J. Ausio.** 2005. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *Bioessays* **27**:50-56.
76. **Reboli, A. C., C. Rotstein, P. G. Pappas, et al.** 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **356**:2472-2482.
77. **Rex, J. H., M. A. Pfaller, T. J. Walsh, et al.** 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* **14**:643-58, table.
78. **Riggs, C. E.** 1996. Antitumor Antibiotics and Related Compounds, p. 324-328. *In* The Chemotherapy Source Book.
79. **Rodaki, A., I. M. Bohovych, B. Enjalbert, et al.** 2009. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **20**:4845-4855.
80. **Ruhnke, M.** 2006. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr. Drug Targets.* **7**:495-504.
81. **Ruhnke, M.** 2007. p. 56-70. *In* Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten. Uni-Med, Bremen.

82. **Ruhnke, M., A. Eigler, I. Tennagen, et al.** 1994. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* **32**:2092-2098.
83. **Ruhnke, M., K. Hartwig, and G. Kofla.** 2008. New options for treatment of candidaemia in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 4**:46-54.
84. **Sanchez-Portocarrero, J., E. Perez-Cecilia, O. Corral, J. Romero-Vivas, and J. J. Picazo.** 2000. The central nervous system and infection by *Candida* species. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **37**:169-179.
85. **Sanglard, D., F. Ischer, and J. Bille.** 2001. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1174-1183.
86. **Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:241-253.
87. **Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille.** 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143 (Pt 2)**:405-416.
88. **Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, et al.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:2378-2386.
89. **Schild TA.** 1996. Einführung in die Real-Time TaqMan-PCR-Technologie. Applied Biosystems GmbH 4-5.
90. **Schubert, S., P. D. Rogers, and J. Morschhauser.** 2008. Gain-of-function mutations in the transcription factor MRR1 are responsible for overexpression of the MDR1 efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:4274-4280.
91. **Shahi, P. and W. S. Moye-Rowley.** 2009. Coordinate control of lipid composition and drug transport activities is required for normal multidrug resistance in fungi. *Biochim.Biophys.Acta* **1794**:852-859.
92. **Shanmugam, N., R. Isenmann, J. S. Barkin, and H. G. Beger.** 2003. Pancreatic fungal infection. *Pancreas* **27**:133-138.
93. **Shukla, S., V. Rai, D. Banerjee, and R. Prasad.** 2006. Characterization of Cdr1p, a major multidrug efflux protein of *Candida albicans*: purified protein is amenable to intrinsic fluorescence analysis. *Biochemistry* **45**:2425-2435.
94. **Shukla, S., C. P. Wu, and S. V. Ambudkar.** 2008. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert.Opin.Drug Metab Toxicol.* **4**:205-223.

95. **Sims, C. R., L. Ostrosky-Zeichner, and J. H. Rex.** 2005. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch.Med Res.* **36**:660-671.
96. **Slavin, M. A., B. Osborne, R. Adams, et al.** 1995. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation--a prospective, randomized, double-blind study. *J.Infect.Dis.* **171**:1545-1552.
97. **Sobel, J. D.** 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* **369**:1961-1971.
98. **Soysa, N. S. and A. N. Ellepola.** 2005. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis.* **11**:268-273.
99. **Soysa, N. S., L. P. Samaranayake, and A. N. Ellepola.** 2006. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet.Med.* **23**:455-459.
100. **Soysa, N. S., L. P. Samaranayake, and A. N. Ellepola.** 2004. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncol.* **40**:971-978.
101. **Sullivan, D. J., G. P. Moran, E. Pinjon, et al.** 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **4**:369-376.
102. **Sullivan, D. J., T. J. Westerneng, K. A. Haynes, D. E. Bennett, and D. C. Coleman.** 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141 (Pt 7)**:1507-1521.
103. **Sundstrom, P.** 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol.* **4**:461-469.
104. **ten Cate, J. M., F. M. Klis, T. Pereira-Cenci, W. Crielaard, and P. W. de Groot.** 2009. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J.Dent.Res.* **88**:105-115.
105. **Uzun, O. and E. J. Anaissie.** 1995. Antifungal prophylaxis in patients with hematologic malignancies: a reappraisal. *Blood* **86**:2063-2072.
106. **Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, et al.** 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol.Microbiol.* **61**:704-722.
107. **Vermitsky, J. P. and T. D. Edlind.** 2004. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:3773-3781.
108. **Vogel, M., T. Hartmann, M. Koberle, et al.** 2008. Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans*. *J.Antimicrob.Chemother.* **61**:541-547.
109. **Walsh, T. J., H. Tepler, G. R. Donowitz, et al.** 2004. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N.Engl.J.Med.* **351**:1391-1402.

110. **Warnock, D. W.** 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin.Gakkai Zasshi* **48**:1-12.
111. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* **11**:382-402.
112. **Wingard, J. R.** 2007. New approaches to invasive fungal infections in acute leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* **20**:99-107.
113. **Yang, Y. L.** 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* **36**:223-228.
114. **Zonios, D. I. and J. E. Bennett.** 2008. Update on azole antifungals. *Semin.Respir.Crit Care Med.* **29**:198-210.

7. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8. Erklärung an Eides Statt

„Ich, Mathias Knobloch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Der Einfluss von Doxorubicin auf die Expression von Resistenzgenen und auf die Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol bei *Candida dubliniensis* und *Candida glabrata*“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin den 01.06.2011

Mathias Knobloch

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ruhnke möchte ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die zahlreichen Anregungen während der Laborbesprechungen danken.

Frau Clarissa Radecke danke ich für die Durchführung der MHK-Bestimmungen sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen.

Bei **Herrn Kai Weber** möchte ich mich für die zahlreichen Ratschläge bedanken, die bei der Durchführung dieser Arbeit sehr hilfreich waren.

Frau Bettina Schulz schulde ich einen besonderen Dank für die gesamte Zeit in der sie mir mit Rat und Tat zur Seite stand und für ein hervorragendes Arbeitsklima sorgte. Vielen Dank für die sorgfältige Korrektur des Manuskriptes.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern **Dorita** und **Ingolf Knobloch**, die während der Anfertigung dieser Arbeit immer für mich da waren und mich in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützten. Meinem Bruder **Michael Knobloch** danke ich für das Korrekturlesen.