

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

DISSERTATION

**Der Einfluss von Doxorubicin auf das ABC-Transporter-
vermittelte Resistenzverhalten gegen Fluconazol bei
Candida-Spezies**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bettina Schulz

aus Kyritz

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Ruhnke
 2. Prof. Dr. med. H. Hof
 3. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Held

Datum der Promotion: 01.02.2013

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	ZUSAMMENFASSUNG	4
2.1	TITEL	4
2.2	AUTORIN	4
2.3	ABSTRACT	4
2.4	EINLEITUNG	5
2.5	ZIELSTELLUNG	6
2.6	METHODIK	7
2.7	ERGEBNISSE	10
2.8	DISKUSSION	13
2.9	REFERENZEN	15
3	ANTEILSERKLÄRUNG	17
4	AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN	19
4.1	ERSTE PUBLIKATION	19
4.2	ZWEITE PUBLIKATION	31
4.3	Dritte PUBLIKATION	38
5	LEBENS LAUF	46
6	PUBLIKATIONS LISTE	47
6.1	KONFERENZBEITRÄGE	47
6.2	PATENTE	49
6.3	WISSENSCHAFTLICHE ARTIKEL	49
7	ERKLÄRUNG	51
8	DANKSAGUNG	52

2 Zusammenfassung

2.1 Titel

Der Einfluss von Doxorubicin auf das ABC-Transporter-vermittelte Resistenzverhalten gegen Fluconazol bei *Candida*-Spezies

2.2 Autorin

Frau Dipl.-Ing. (FH) Bettina Schulz

2.3 Abstract

Für immunsupprimierte Patienten können *Candida*-Infektionen schwerwiegende Folgen haben. Zu diesem Personenkreis gehören auch Menschen, die eine antineoplastische Chemotherapie erhalten und die auf Grund der Krankheit oder der Behandlung immunsupprimiert sind. Für die Behandlung von *Candida*-Infektionen stehen eine Reihe gut wirksamer Antimykotika zur Verfügung, deren Effizienz jedoch durch das Auftreten von Resistenzen eingeschränkt wird. Besonders bei der gleichzeitigen Gabe von zytotoxischen und antimykotischen Substanzen kann ein Versagen der antimykotischen Therapie in der Klinik beobachtet werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen zytotoxischer Substanz und der Resistenzentwicklung von *Candida* zu untersuchen, wurden drei *Candida*-Spezies – *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. glabrata* – mit dem Zytostatikum Doxorubicin (DOX) kultiviert. Der Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol (FLU) wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration sowie mittels Schachbrett-Titrationsen erfasst. Da eine FLU-Resistenz oft durch die Überexpression von *ATP-binding cassette* (ABC)-Transportern vermittelt wird, wurde neben weiteren Analysen die Expression verschiedener Transporterproteine auf mRNA-Ebene in jeder Spezies mittels *real-time* PCR untersucht. Alle drei getesteten *Candida*-Spezies zeigten eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber FLU nach Kultivierung mit DOX. Die Expressionen der untersuchten ABC-Transportergene waren erhöht. Eine ABC-Transporter-vermittelte Unempfindlichkeit kann daher vermutet werden. Allerdings unterschieden sich die

ausgelösten Mechanismen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* erheblich von denen, die in *C. glabrata* beobachtet wurden. Während bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* ein direkter Einfluss von DOX auf die Induktion der Genexpression gezeigt werden konnte, wurde bei *C. glabrata* durch den Selektionsdruck das Auftreten von respiratorisch-defizienten Mutanten beobachtet, die FLU-resistent waren. DOX kann folglich einen Einfluss auf die Resistenzentwicklung von *Candida*-Spezies haben und somit die antimykotische Therapie negativ beeinflussen.

2.4 Einleitung

Auf Grund zahlreicher Faktoren nehmen Pilzinfektionen des Menschen durch die Spezies *Candida* immer mehr zu. Zu diesen Faktoren gehören die Zunahme immunsupprimierter Patienten, Dysfunktionen des Stoffwechsels sowie das Alter der Patienten [1]. Breitbandantibiotika, zytotoxische Chemotherapien sowie Organtransplantationen erhöhen weiterhin das Risiko, an häufigen oder seltenen opportunistischen *Candida*-Infektionen zu erkranken [2, 3]. Am häufigsten tritt innerhalb der Gattung die Art *Candida albicans* auf. Als zweithäufigster Erreger wird *C. glabrata* nachgewiesen, wobei in manchen Patientenkollektiven, wie Älteren oder an Diabetes Erkrankten, diese Art am häufigsten auftritt [4, 5]. Im Gegensatz zu *C. albicans* und *C. glabrata* spielt *C. dubliniensis* als Auslöser von *Candida*-Infektionen eine eher untergeordnete Rolle. Nur ca. 2 % der Fälle werden durch *C. dubliniensis* verursacht, obwohl diese Spezies sehr eng mit *C. albicans* verwandt ist und daher erst 1995 erstmalig beschrieben wurde [6, 7]. Allerdings ist *C. dubliniensis* häufig in HIV-positiven Patienten nachweisbar [8].

Für die antimykotische Therapie werden häufig Substanzen verwendet, die zur Familie der Azole gehören, wobei die Therapie durch das Auftreten von Resistenzen erschwert wird. Dabei bedienen sich *Candida*-Spezies diverser Resistenzmechanismen, um das Überleben der Zelle zu sichern. Häufig werden Gene überexprimiert, die für so genannte *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter kodieren. Diese durch ATP angetriebenen Pumpenproteine schleusen aktiv chemisch sowie strukturell unterschiedlichste Substanzen aus dem Zellinneren heraus und führen daher häufig zu so genannten *Multidrug*-Resistenzen, die eine Therapie besonders erschweren können. Zwei ABC-Transporter, Cdr1p sowie Cdr2p, treten oft in Verbindung mit einer Resistenzentwicklung auf. Die dazugehörigen Gene *CDR1* und *CDR2* sind innerhalb der *Candida*-Gattung stark konserviert. *C. glabrata* ist zudem in der Lage ein weiteres ABC-Transporterprotein, kodiert durch das Gen *CgSNQ2*, für die Abwehr von

antimykotischen Substanzen einzusetzen [9]. Das Netzwerk dieser energiegetriebenen Pumpen wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert, die die Expression der Gene regulieren. Bei *C. albicans* geschieht dies durch CaTac1p, kodiert durch das Gen *CaTAC1*. Das Pendant von *C. glabrata* ist CgPdr1p, kodiert durch *CgPDR1*. Bei *C. dubliniensis* ist die Regulation der ABC-Transporter noch weitgehend unerforscht. Die Aminosäuresequenz des Proteins CdTac1p ist jedoch zu 88 % identisch mit der von CaTac1p und das Protein erfüllt wahrscheinlich ähnliche Aufgaben wie in *C. albicans* [10].

Neben der Überexpression von ABC-Transportern gibt es weitere Resistenzmechanismen, die oft in Zusammenhang mit Azol-Resistenzen auftreten. Dazu gehört die erhöhte Expression von *MDR1*, dem Gen für einen *major facilitator* (MF)-Transporter, die erhöhte Expression von *ERG11*, dem Gen für das Enzym Sterol-14 α -Demethylase, dem Angriffsmolekül des Azols Fluconazol (FLU) sowie Punktmutationen im Gen *ERG11*. Auch Veränderungen am Gen *ERG3*, das für das Enzym Sterol- Δ 5,6-Desaturase kodiert, werden neben weiteren Mechanismen bei resistenten *Candida* Isolaten beobachtet.

Resistenzen können bei *Candida* nicht nur durch Antimykotika ausgelöst werden, sondern auch durch Antibiotika sowie zytotoxische Substanzen [11, 12, 13]. Gerade letztere könnten für immunsupprimierte Patienten ein Problem darstellen, denn klinische Beobachtungen zeigen, dass bei Patienten, die unter einer Chemotherapie-refraktären Krebserkrankung leiden, oft auch die antimykotische Therapie versagt. Ein Grund hierfür könnte in der Ähnlichkeit zwischen den Resistenzmechanismen von Tumor- und Hefezelle liegen, die folglich durch eine einzelne Substanz ausgelöst werden könnten. Tatsächlich besitzt der humane ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-gp), dessen kodierendes Gen *HsMDR1* in resistenten Tumorzellen vermehrt exprimiert wird, eine große Ähnlichkeit mit dem Transportprotein Cdr1p der Gattung *Candida*. Das Zytostatikum Doxorubicin (DOX), bekannt als Auslöser für erhöhte Expressionen von *HsMDR1* und somit P-gp, könnte auf Grund der Ähnlichkeit zwischen P-gp und Cdr1p ebenfalls einen Einfluss auf die Expression des fungalen *CDR1* und somit indirekt auf die Empfindlichkeit gegenüber Azolen haben. Eine solche Interaktion könnte eine antimykotische Therapie erschweren.

2.5 Zielstellung

Die Interaktion zwischen DOX und der Expression fungaler ABC-Transporterproteine stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Es sollte untersucht werden, inwieweit DOX die Expression beeinflusst und welche Auswirkungen dies auf die Empfindlichkeit der Hefezelle gegenüber

dem Antimykotikum FLU hat. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen den *Candida*-Spezies gibt. So wurde neben *C. albicans* die Spezies *C. dubliniensis* ausgewählt, die zwar eine sehr enge Verwandtschaft zu *C. albicans* aufweist aber weniger virulent ist. *C. glabrata* wird am zweithäufigsten in der Klinik nachgewiesen und ist im Gegensatz zu *C. dubliniensis* weitaus virulenter und nur noch entfernt mit *C. albicans* verwandt.

2.6 Methodik

Isolate und deren Kultivierung

Mehrere Isolate von jeder der drei untersuchten *Candida*-Spezies wurden für die Untersuchungen verwendet. Für die Experimente mit *C. albicans* wurden drei Isolat-Pärchen herangezogen, die aus der Mundhöhle von HIV-Patienten jeweils vor und nach der Behandlung mit FLU stammen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit mit Isolaten zu arbeiten, die zunächst noch sensibel gegenüber FLU waren und nach der Behandlung mit FLU einen resistenten Phänotyp aufwiesen. Für die Experimente mit *C. dubliniensis* wurden drei klinische FLU-sensible Isolate (Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland) sowie ein FLU-sensibler Referenzstamm (DSM 13268) ausgewählt. Für die Arbeit mit *C. glabrata* wurden ebenfalls ein FLU-sensibler Referenzstamm (DSM 11950) sowie zwei FLU-sensible und ein FLU-resistentes Isolat aus der Klinik verwendet.

Die Isolate wurden bei -80°C in Glycerin aufbewahrt. Für die Subkultivierung wurden sie über Nacht auf Vollmedium bei 30°C inkubiert und danach für die Weiterverwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Behandlung der Isolate mit Doxorubicin

Um den Einfluss der antineoplastischen Substanz DOX auf die Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurden die *Candida*-Spezies in verschiedenen Ansätzen in Anwesenheit von DOX kultiviert. Dabei wurde in allen Experimenten die im Menschen therapeutisch erreichbare Serumkonzentration von 20 µg/ml und das Flüssigvollmedium YPD verwendet. Alle drei Spezies wurden in einem Kurzzeitversuch über 90 min mit DOX inkubiert und zusätzlich wurde in einer länger andauernden Kultivierung die Langzeitwirkung beobachtet. Die *C. albicans*-Isolate wurden über 24 h mit DOX inkubiert, während in den Arbeiten mit *C. dubliniensis* und *C. glabrata* die Isolate über 10 Tage hinweg mit DOX kultiviert wurden. Das Medium wurde regelmäßig an den Tagen 1, 2, 3, 6 und 8 gewechselt und dabei Proben –

auch von Tag 10 – für die anschließende Genexpressionsanalyse und Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) genommen. Als Kontrolle wurden die gleichen *Candida*-Isolate über die oben angegebenen Zeiträume in YPD kultiviert, jedoch ohne die Zugabe von DOX.

Bestimmung der MHK

Der Einfluss von DOX auf die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber FLU wurde durch die Bestimmung der MHK-Werte ermittelt. Dafür wurde in allen Arbeiten das standardisierte Protokoll M27-A verwendet [14].

RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Vor der RNA-Extraktion wurde die fungale Zellwand mit Hilfe von Lysing Matrix C-Röhrchen und dem FastPrep[®] FP120A-Instrument (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) mechanisch aufgebrochen. Anschließend wurde die RNA mittels RNA-PLUS[™]-Lösung (Qbiogene) extrahiert und die erhaltene Konzentration und Qualität photometrisch gemessen. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA eingesetzt. Mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA wurden durch einen DNase-Verdau entfernt.

Genexpressionsanalysen fungaler Resistenzgene

Da eine Überexpression von Resistenzgenen ein möglicher Auslöser für die Entwicklung von Resistenzen ist, wurden bei allen drei untersuchten *Candida*-Spezies nach Exposition von DOX die Expressionen verschiedener bekannter Resistenzgene untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei die ABC-Transporter. Zwei ABC-Transporter, Cdr1p sowie Cdr2p, werden in allen drei untersuchten *Candida*-Spezies exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Ausprägung des Resistenzverhaltens. Die dazugehörigen Gene *CDR1* und *CDR2* wurden daher in allen *Candida*-Spezies untersucht. Ferner wurden für *C. albicans* die Expressionen der Gene *CaMDR1* sowie *CaERG11* und für *C. dubliniensis* ebenfalls *CdMDR1*, *CdERG11* sowie *CdERG3* untersucht. Für *C. glabrata* wurde zusätzlich das ABC-Transportergen *CgSNQ2* und der das ABC-Transporternetzwerk regulierende Transkriptionsfaktor *CgPDR1* gemessen. Als Referenz wurde für alle *Candida*-Spezies die Expression des Gens *ACT1* hinzugezogen.

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels *real-time* PCR am LightCycler[®] 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Primer und Sonden der zu untersuchenden Gene (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) wurden vor den Experimenten auf ihre Funktionalität und

Effizienz überprüft und die PCR-Bedingungen entsprechend optimiert. So genannte *no template*-Kontrollen, die keine cDNA enthielten, wurden in allen Läufen inkludiert, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Die jeweiligen Genexpressionen wurden durch die relative Quantifizierung ermittelt. Dabei wurden die am LightCycler® 480 gemessenen Werte eines Zielgens mit den entsprechenden Werten des Referenzgens normalisiert und anschließend in Beziehung zu den Werten der unbehandelten Kontrolle gesetzt ($\Delta\Delta C_T$ -Methode).

Schachbrett-Titration mit DOX und FLU

Eine so genannte Schachbrett-Titration (*checkerboard dilution test*) mit den Substanzen FLU und DOX wurde für die Isolate von *C. dubliniensis* und *C. glabrata* durchgeführt, um den unmittelbaren Einfluss von DOX auf die Empfindlichkeit gegenüber FLU zu testen. In einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen werden die beiden Substanzen schrittweise verdünnt und eine Zellsuspensionen des zu untersuchenden Isolates zugegeben. Nach der Inkubation wurde festgestellt, in welchen Vertiefungen Wachstum vorlag und in welchen sich die Zellen nicht vermehren konnten. Neben der optischen Auswertung wurde zusätzlich der fraktionelle Hemmkonzentrationsindex (*fractional inhibitory concentration* (FIC)-index) berechnet [15]. Überschreitet dieser den festgelegten Grenzwert von 4, liegt ein antagonistischer Effekt von DOX auf die Empfindlichkeit der Isolate von FLU vor. Ist der berechnete FIC-Index gleich oder kleiner als 4, hat DOX keinen Einfluss auf die FLU-Empfindlichkeit [16].

Für die *C. albicans* Isolate wurde ein anderer Ansatz gewählt. Die Isolate wurden in Anwesenheit von unterschiedlichen FLU-Konzentrationen inkubiert und die MHK_{50} bestimmt. In einem zweiten Ansatz wurden zusätzlich zu den FLU-Verdünnungen 20 $\mu\text{g/ml}$ DOX zugegeben und erneut die MHK_{50} gemessen. Beide Ansätze wurden danach in Relation gesetzt.

Isolierung von atmungsdefizienten Mutanten und deren Charakterisierung

Die Langzeitinkubation mit DOX über 10 Tage wurde für die *C. glabrata* Isolate wiederholt. An den Tagen 1, 2, 3, 6 und 8 wurde ein Mediumswechsel vorgenommen und gleichzeitig eine Probe der jeweiligen Zellsuspension entnommen (inklusive Tag 10). Die Probe wurde gewaschen und auf YPD-Agarplatten aufgebracht. Auf diesen Platten wachsen sowohl atmungsdefiziente als auch atmungskompetente Zellen. Nach Inkubation und Wachstum der Kolonien wurden diese mit Hilfe von Samstempeln auf YPG-Agarplatten transferiert, in denen Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle enthalten ist. Auf diesen Platten können

atmungsdefiziente Zellen nicht wachsen und durch Vergleich von YPD- und den entsprechenden YPG-Platten können diese dann ermittelt und gezählt werden.

Von jedem getesteten *C. glabrata* Isolat wurden einzelne atmungsdefiziente Mutanten selektiert und separat kultiviert. Anschließend wurden die MHK-Werte für FLU bestimmt sowie Genexpressionsanalysen für *CgCDR1*, *CgCDR2*, *CgSNQ2* sowie *CgPDR1* durchgeführt.

Charakterisierung des Gens *CdCDR1*

Es ist bekannt, dass ca. 50 % aller *C. dubliniensis* Isolate ein verkürztes und nicht funktionierendes CdCdr1p besitzen [17]. Dies ist bedingt durch einen so genannten *single nuclear polymorphism*, wodurch in der Sequenz für *CdCDR1* ein Stop-Codon auftritt. Die für diese Arbeit verwendeten Isolate wurden daher hinsichtlich des Auftretens dieses *single nuclear polymorphism* untersucht [17].

lacZ*-Reportersysteme für *CaCDR2* und *CaMDR1

Neben den Genexpressionsanalysen von *C. albicans* wurde der Effekt von DOX auf die Gene *CaMDR1* und *CaCDR2* ebenfalls mittels *lacZ*-Reportersystemen untersucht. Die Sequenz des Gens für das Enzym β -Galactosidase wurde hierbei hinter der Promotorregion für die Gene *CaCDR2* und *CaMDR1* eingefügt und die Aktivität des Enzyms nach Inkubation mit DOX gemessen [18].

Untersuchungen des Einflusses von DOX auf Proteinebene

Der Einfluss von DOX wurde bei *C. albicans* zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Zum einen wurden die Expressionen von CaCdr1p, CaCdr2p sowie CaMdr1p der klinischen Isolat-Pärchen nach Inkubation mit DOX mittels Westernblot untersucht [18].

Zum anderen wurden die ABC-Transportergene *CaCDR1* sowie *CaCDR2* mit der Sequenz für das *green fluorescent protein* (GFP) fusioniert und nach Inkubation mit DOX die Expression der GFP-Fusionsproteine mikroskopisch lokalisiert [18].

2.7 Ergebnisse

C. albicans

Bei *C. albicans* lag die Besonderheit darin, dass für einige Untersuchungen klinische Isolat-Pärchen zur Verfügung standen, von denen jeweils ein Partner FLU-sensibel war und der

entsprechende andere Partner FLU-resistent. So konnte bei den Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von 20 µg/ml DOX die Expression der Gene *CaCDR1* sowie *CaCDR2* nach 90-minütiger Inkubation sowohl bei den FLU-sensiblen als auch den FLU-resistenten Isolaten induziert werden konnte. Auch nach 24 Stunden konnte eine erhöhte Expression für *CaCDR1* nachgewiesen werden. Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung des für die ABC-Transporterexpression notwendigen Transkriptionsfaktors CaTac1p zu untersuchen, wurde für die Genexpressionsanalysen eine *tac1Δ/Δ knock-out* Mutante hinzugezogen. Die Inkubation mit DOX konnte in dieser Mutante keine *CaCDR1*- bzw. *CaCDR2*-Expression induzieren, was darauf hindeutet, dass die DOX-vermittelte Induktion in Zusammenhang mit CaTac1p steht.

Die Inkubation mit DOX hatte keinen Einfluss auf die Expression der ebenfalls untersuchten resistenzassoziierten Gene *CaMDR1* sowie *CaERG11*.

Zusätzlich wurden diese Experimente mit Cyclophosphamid, einem weiteren Zytostatikum, das keine induzierende Wirkung auf das Gen des humanen ABC-Transporters P-gp besitzt, durchgeführt. Im Gegensatz zu DOX wurde keine Induktion der untersuchten fungalen Resistenzgene durch Cyclophosphamid festgestellt.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden durch den Einsatz des *lacZ*-Reportersystems für die Gene *CaCDR2* sowie *CaMDR1* bestätigt. Durch die Inkubation mit DOX konnte die Aktivität der β-Galactosidase des *CaCDR2-lacZ*-Reporters zeit- sowie konzentrationsabhängig erhöht werden. Die Aktivität des *CaMDR1-lacZ*-Reporters konnte jedoch durch die Inkubation mit DOX nicht erhöht werden.

Auf Proteinebene wurde die Expression der Fusionsproteine *CaCDR1*-GFP und *CaCDR2*-GFP vor und nach Inkubation mit DOX untersucht. Ähnlich wie bei den Genexpressionsanalysen konnte ein eindeutiger Effekt von DOX auf die Expression der Fusionsproteine beobachtet werden. Auch hier konnte Cyclophosphamid keine Induktion bewirken. Die Westernblot-Versuche mit Antikörpern gegen CaCdr1p, CaCdr2p sowie CaMdr1p bestätigten ebenfalls die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für die FLU-sensiblen Isolate der untersuchten Pärchen. Die Ergebnisse für die FLU-resistenten Partner waren heterogen. Bei Isolaten, die eine hohe intrinsische FLU-Resistenz durch eine *CaMDR1*-Überexpression aufwiesen, konnte kein DOX-induzierter Anstieg von CaCdr1p und CaCdr2p beobachtet werden.

Um festzustellen, ob die Anwesenheit von DOX die Empfindlichkeit der FLU-sensiblen Isolate für FLU erhöht, wurden diese mit DOX und FLU in unterschiedlichen Konzentrationen gemeinsam inkubiert. In der Gegenwart von DOX überlebten die Isolate höhere FLU-Konzentrationen als ohne DOX. Jedoch wurden nicht die MHK-Werte der FLU-resistenten Isolate erreicht.

C. dubliniensis

Wie schon bei *C. albicans* zeigte die Exposition von DOX über 90 min einen Einfluss auf die Expression der ABC-Transportergene. So war *CdCDR2* im Vergleich zur Kontrolle in allen Isolaten überexprimiert, zwei Isolate zeigten eine erhöhte *CdCDR1*-Expression. Die Langzeitinkubation mit DOX über 10 Tage bestätigte das Ergebnis des Kurzzeitversuches und zeigte eine erhöhte *CdCDR2*-Expression aller untersuchten Isolate über den gesamten Versuchszeitraum. Allerdings war in diesem Ansatz die *CdCDR1*-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht erhöht. Sowohl im Kurzzeitversuch als auch während der langfristigen Exposition wurden die Gene *CdMDR1*, *CdERG3* sowie *CdERG11* nicht durch DOX induziert.

Die Schachbrett-Titration mit DOX und FLU zeigte für die untersuchten *C. dubliniensis* Isolate einen eindeutig antagonistischen Effekt von DOX auf die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber FLU. Alle Isolate erhöhten die MHK für FLU zwischen zwei und vier Titerstufen in Anwesenheit von DOX. Die berechneten FIC-Indices lagen über dem Grenzwert von 4.

Der bereits beschriebene *single nuclear polymorphism*, der in einem verkürzten und nicht funktionstüchtigen CdCdr1p resultiert, wurde in zwei der vier untersuchten *C. dubliniensis* Isolate gefunden.

C. glabrata

Die Kurzzeitexposition von DOX induzierte keines der untersuchten Resistenzgene in *C. glabrata*. Jedoch zeigten die drei FLU-sensiblen Isolate eine erhöhte Expression der Gene im Langzeitversuch. Die *CgCDR1*-Expression wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am stärksten induziert.

Im Gegensatz zu *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurde in der Schachbrett-Titration kein antagonistischer Effekt von DOX festgestellt. Die Empfindlichkeit der *C. glabrata* Isolate

gegenüber FLU veränderte sich nicht. Der berechnete FIC lag bei 2 und damit deutlich unter dem Grenzwert von 4.

Während der Langzeitexposition von DOX konnte ab Tag 6 in zwei der vier untersuchten *C. glabrata* Isolate eine erhöhte MHK für FLU festgestellt werden, die bis zum Tag 10 weiter anstieg. Diese Beobachtung korrelierte mit dem Auftreten von atlungsdefizienten Mutanten ab Tag 6 in den drei FLU-sensiblen Isolaten. Nach Selektion der Mutanten und separater Kultivierung wurden Genexpressionsanalysen sowie MHK-Bestimmungen durchgeführt. Die Expressionen der ABC-Transportergene *CgCDR1* sowie *CgCDR2* waren stark erhöht, sowohl im Vergleich mit DOX-behandelten respiratorisch kompetenten Zellen als auch unbehandelten Kontrollen. Für *CgSNQ2* sowie *CgPDR1* wurde ebenfalls eine erhöhte Expression festgestellt. Die MHK-Werte für FLU aller getesteten atlungsdefizienten *C. glabrata* Mutanten lagen im resistenten Bereich, während die Werte für die DOX-behandelten atlungskompetenten Zellen sowie unbehandelten Kontrollen im konzentrationsabhängig-sensiblen Bereich lagen.

2.8 Diskussion

Alle drei untersuchten *Candida*-Spezies zeigten nach der Exposition mit DOX eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber FLU, die hauptsächlich ABC-Transporter-vermittelt war. Dabei bedienten sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf Grund ihrer engen Verwandtschaft anderer Mechanismen als *C. glabrata*.

DOX erweitert somit die Liste der Substanzen, die eine Induktion von *CaCDR1* und *CaCDR2* in *C. albicans* bewirken. Dazu gehören neben Steroiden auch Medikamente wie Fluphenazin oder antimykotische Substanzen wie Terbinafin [12, 13]. Wenn *C. albicans* diesen Substanzen ausgesetzt wird, wird die Expression von *CaCDR1* sowie *CaCDR2* transient hochreguliert, was vermutlich darin begründet liegt, dass die Substanzen selbst Substrate der Transporter sind. Nach der Induktion der Expression werden die Stoffe aus der Zelle entfernt und verlieren dadurch ihr Induktionspotential. Die Expression wird wieder eingestellt [13]. Es ist nicht bekannt, ob DOX ein Substrat von *CaCDR1* oder *CaCDR2* ist. Nach 24-stündiger Exposition mit DOX waren in *C. albicans* noch immer die Expressionen für *CaCDR1* und *CaCDR2* erhöht, woraus man schließen könnte, dass DOX nicht vollständig aus der Zelle entfernt wurde und daher wahrscheinlich nur mäßig via ABC-Transporter ausgeschieden

werden konnte. Eine entscheidende Rolle scheint in diesem Zusammenhang auch der Transkriptionsfaktor CaTac1p zu spielen, da in der entsprechenden *knock-out* Mutante, die ABC-Transporter-Expression nicht durch DOX induziert werden konnte. Auch bei der Induktion des humanen ABC-Transportergens *HsMDR1* spielt die Interaktion von DOX mit sogenannten *drug responsive elements* (DRE) im Promotorbereich des Gens eine wichtige Rolle. Das Zusammenwirken von DOX und den DRE ist Auslöser bei *Multidrug*-Resistenzen während der Chemotherapie [19].

Eine der Konsequenzen, die aus der Induktion von Transporterproteinen durch entsprechende Substanzen resultiert, ist der daraus entstehende Antagonismus bezogen auf die Empfindlichkeit gegenüber antimykotischen Substanzen [20]. Durch den Einfluss von beispielsweise DOX ist die Hefezelle in der Lage höhere FLU-Konzentrationen zu überleben. Obwohl diese Konzentrationen nicht den MHK-Werten resistenter Isolate entsprochen haben, könnte der vermutete Antagonismus zwischen der Wirkung von DOX und FLU eine klinische Relevanz haben. Es wäre möglich, dass die Effizienz der antimykotischen Behandlung einer *C. albicans*-Infektion unter einer Chemotherapie abnehmen könnte.

C. dubliniensis reagierte auf die gleiche Weise wie *C. albicans* auf die Exposition von DOX. In Anwesenheit der antineoplastischen Substanz überlebten die Zellen Konzentrationen von FLU, die bis zu vier Stufen über der MHK lagen. Diese verringerte Empfindlichkeit gegenüber FLU wird im Gegensatz zu *C. albicans* bei *C. dubliniensis* vermutlich hauptsächlich durch CdCdr2p vermittelt. CdCdr1p spielte eine eher untergeordnete Rolle sowohl in Isolaten dessen CdCdr1p intakt war also auch in Isolaten, die über ein verkürztes CdCdr1p verfügten. Für *C. dubliniensis* konnte zum ersten Mal eine Interaktion zwischen einer antineoplastischen Substanz und der Expression eines ABC-Transporterproteins gezeigt werden.

Die Wirkung von DOX auf *C. glabrata* unterschied sich grundlegend von den Mechanismen, die bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* beobachtet wurden. Vermutlich ist diese Diskrepanz in der Verwandtschaft der Spezies begründet. *C. glabrata* ist phylogenetisch eher mit *Saccharomyces cerevisiae* verwandt und teilt mit dieser Gattung auch den haploiden Chromosomensatz. *C. albicans* und *C. dubliniensis* besitzen jeweils einen diploiden Chromosomensatz.

Nach Exposition von DOX konnte in *S. cerevisiae* das Auftreten von atemungsdefizienten Mutanten (auch *petite*-Mutanten genannt) beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde

ebenfalls während des Langzeitversuches über 10 Tage bei *C. glabrata* gesehen. Mit dem ersten Auftreten der *petite*-Mutanten an Tag 6 erhöhte sich die MHK gegenüber FLU bis hin zu Werten resistenter Isolate an Tag 10. Da diese Beobachtungen gegen einen Induktionsmechanismus sprechen, wird vermutet, dass die atmungsdefizienten Mutanten eher durch DOX selektiert als induziert werden [21]. Ausgewählte *petite*-Mutanten waren FLU-resistent und zeigten ausgeprägte Überexpressionen aller untersuchten ABC-Transportergene sowie des Gens *CgPDR1*, das für den Transkriptionsfaktor CgPdr1p kodiert.

Das Auftreten dieser Mutanten konnte in vorhergehenden Arbeiten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden [22, 23]. Das *in vivo* aufgetretene respiratorisch defiziente Isolat war hoch resistent und stammte aus einem Patienten unter Azol-Therapie. Diese Mutante zeigte darüber hinaus im Tiermodell eine höhere Virulenz als das Vorläufer-Isolat [23].

Die Interaktion zwischen DOX und *C. glabrata* könnte somit während einer Infektion zum Auftreten von resistenten *petite*-Mutanten führen und ein Grund für das Versagen einer antimykotischen Therapie sein. Wie auch bei *C. dubliniensis* zeigt diese Arbeit zum ersten Mal den Einfluss eines zytotoxischen Medikamentes auf die Resistenzentwicklung von *C. glabrata*.

2.9 Referenzen

1. Pfaller MA and Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133-163.
2. Nucci M and Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 521-526.
3. Pfaller MA and Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4419-4431.
4. Goswami D, Goswami R, Banerjee U, et al. Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. *J Infect* 2006; **52**: 111-117.
5. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **68**: 278-283.
6. Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, et al. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J Hosp Infect* 2003; **54**: 18-24.
7. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; **141** (Pt 7): 1507-1521.

8. Coleman D, Sullivan D, Harrington B, et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis* 1997; **3 Suppl 1**: S96-101.
9. Torelli R, Posteraro B, Ferrari S, et al. The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 2008; **68**: 186-201.
10. Sanger Institute. *Candida dubliniensis* sequencing. www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/.
11. Vogel M, Hartmann T, Koberle M, et al. Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 541-547.
12. Karababa M, Coste AT, Rognon B, Bille J, Sanglard D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3064-3079.
13. de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 1197-1214.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Approved standard M27-A* 1997; Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
15. Dougherty PF, Yotter DW, Matthews TR. Microdilution transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; **11**: 225-228.
16. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1.
17. Moran G, Sullivan D, Morschhäuser J, Coleman D. The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2829-2841.
18. Kofla G, Turner V, Schulz B, et al. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2011; **49**: 132-142.
19. Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M. The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**: 1415-1421.
20. Henry KW, Cruz MC, Katiyar SK, Edlind TD. Antagonism of azole activity against *Candida albicans* following induction of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1968-1974.
21. Hixon SC, Ocak A, Thomas JE, Daugherty JP. Resistance to adriamycin cytotoxicity among respiratory-deficient mutants in yeast. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **17**: 443-449.
22. Bouchara JP, Zouhair R, Le BS, et al. In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol* 2000; **49**: 977-984.
23. Ferrari S, Sanguinetti M, De BF, et al. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1852-1860.

3 Anteilserklärung

Erklärung über Mitwirkung und Anteil der Promovendin Bettina Schulz bei der Erstellung der vorgelegten Publikationen:

Publikation 1

Kofla G, Turner V, Schulz B, Storch U, Froelich D, Rognon B, Coste AT, Sanglard D, Ruhnke M. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Medical Mycology* 2011

Beitrag: 25 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der Genexpressionsanalysen (Kultivierung der Isolate mit Doxorubicin über 90 Minuten sowie 24 Stunden inklusive Kontrollen, RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, *real-time* PCR inklusive Etablierung/Optimierung von Primer und Sonden sowie Auswertung inklusive Statistik), Erstellung und Layout von vier der sechs Grafiken, Erstellung der Tabellen, Mitarbeit bei Erstellung des Textes, Einreichen des Manuskriptes sowie Handling und Management während der Begutachtungsphase

Publikation 2

Schulz B, Knobloch M, Moran GP, Weber K, Ruhnke M. Influence of doxorubicin on fluconazole susceptibility and efflux pump gene expression of *Candida dubliniensis*. *Medical Mycology* 2012

Beitrag: 40 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Unterstützung bei den Genexpressionsanalysen sowie bei der Etablierung/Optimierung von Primer und Sonden, Planung und Auswertung der Schachbrett-titrationen und MHK-Bestimmungen, Koordination der Zusammenarbeit und Kommunikation mit Dr. Gary Moran, komplette Erstellung des Manuskriptes inklusive Grafiken und Tabellen, Einreichen des Manuskriptes sowie Handling und Management während der Begutachtungsphase

Publikation 3

Schulz B, Knobloch M, Weber K, Ruhnke M. Doxorubicin selects for fluconazole-resistant petite mutants in *Candida glabrata* isolates. *International Journal of Medical Microbiology* 2012

Beitrag: 55 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Unterstützung bei den Genexpressionsanalysen sowie bei der Etablierung/Optimierung von Primer und Sonden, Planung und Auswertung der Schachbretttrationen, Langzeitkultivierung der Isolate mit Doxorubicin hinsichtlich Selektion von respiratorisch-defizienten Mutanten inklusive Kontrollen, Genexpressions-analysen der Mutanten (Kultivierung, RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, *real-time* PCR sowie Auswertung), komplette Erstellung des Manuskriptes inklusive Grafiken und Tabellen, Einreichen des Manuskriptes sowie Handling und Management während der Begutachtungsphase

Berlin, den

Dipl.-Ing. (FH) Bettina Schulz

4 Ausgewählte Publikationen

4.1 Erste Publikation

Kofla G., Turner V., Schulz B., Storch U., Froelich D., Rognon B., Coste A.T., Sanglard D., Ruhnke M. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Medical Mycology* (2011) 49(2): 132-142.

4.2 Zweite Publikation

Schulz B., Knobloch M., Moran G.P., Weber K., Ruhnke M. Influence of doxorubicin on fluconazole susceptibility and efflux pump gene expression of *Candida dubliniensis*. Medical Mycology (2012) 50(4): 421-426.

4.3 Dritte Publikation

Schulz B., Knobloch M., Weber K., Ruhnke M. Doxorubicin selects for fluconazole-resistant petite mutants in *Candida glabrata* isolates. International Journal of Medical Microbiology (2012) 302(3): 155-161.

5 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6 Publikationsliste

6.1 Konferenzbeiträge

Poster

Blackman L.M., Schulz B., Mitchell H.J., Hardham A.R. Changes in the activity of catalase but not superoxide dismutase occur in *Phytophthora nicotianae* during development and the infection of tobacco seedlings. Plant Cell Biology, Research School of Biological Sciences, Australian National University, ACT; ComBio 2003, 29th September – 02nd October 2003 Melbourne.

Frölich D., Kofla G., Schulz B., Ruhnke M. Influence of cyclophosphamide on the expression of different resistance genes in *Candida albicans*, 40. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 07. – 09. September 2006 Innsbruck; Poster 5.

Schulz B., Weber K., Fleischhacker M., Ruhnke M. Changes in Adherence but not Virulence of Fluconazole-resistant *Candida albicans*. Second FEBS Advanced Lecture Course, Human Fungal Pathogens, 11th – 17th May 2007 La Colle sur Loup, France; Poster 124A.

Schulz B., Knobloch M., Weber K., Ruhnke M. Doxorubicin-induced resistance to fluconazole and increased expression of the efflux pump *CDR1* in *Candida glabrata* but not in *Candida dubliniensis*. 9th Candida and Candidiasis, ASM Conferences, 24th – 28th March 2008 Jersey City, New Jersey, A76.

Schulz B., Radecke C., Weber K., Ruhnke M. Differential time-dependent resistance development of *Candida albicans* clinical isolates during long-term exposure to fluconazole. 42. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 04. - 06. September 2008 Jena; P20.

Schulz B., Knobloch M., Weber K., Ruhnke M. Die Bedeutung von *Candida glabrata petite*-Mutanten für die Resistenzentwicklung nach Exposition mit dem Zytostatikum Doxorubicin. 44. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 09. – 11. September 2010 Wien; P31.

Schulz B., Knobloch M., Weber K., Ruhnke M. Doxorubicin selects for fluconazole-resistant petite mutants in *Candida glabrata* isolates. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 11th – 15th June 2012 Berlin; P234.

Vorträge

Schulz B., Ruhnke M. Screening haematological patients using fungal PCR. Oral presentation during meeting on behalf of establishment of the European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI), working group of the International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM), 25.06.2006, Paris, France.

Storch U., Kofla G., Schulz B., Ruhnke M. Influence of cytostatic agents doxorubicin and vincristin on the expression of resistance genes in *Candida albicans* (Induktion von Resistenzgenen in *Candida albicans* durch die Zytostatika Doxorubicin und Vincristin). 40. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 08. September 2006 Innsbruck; Workshop 3-2.

Schulz B., Schmidt A., Borg-von Zepelin M., Ruhnke M. Fluconazol resistance is not associated with higher virulence in *Candida albicans* clinical isolates (Fluconazol-resistente *Candida albicans* Isolate zeigen keine erhöhte Virulenz). 41. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 07. September 2007 Berlin; R13.

Schulz B., Weber K., Ruhnke M. Fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolates show co-expression of *MDR1* and *CSH1* (Simultane Expression von *MDR1* und *CSH1* in klinischen Fluconazol-resistenten *Candida albicans* Isolaten). 43. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V., 04. September 2009 Köln; R06-04.

6.2 Patente

Patent WO 2006/117242 A2 „Verfahren zur Charakterisierung der Transaktivierungs- und Transrepressionsaktivität von Glukokortikoidrezeptor-Liganden in primären Immunzellen“
Döcke Wolf-Dietrich, Rentzsch Christine, Schäcke Heike, Schmees Norbert, Rehwinkel Hartmut, Schulz Bettina, Golletz Patrick, Stock Christine, Schering AG, 2006.

6.3 Wissenschaftliche Artikel

Weber K., Sohr R., Schulz B., Fleischhacker M., Ruhnke M. Secretion of *E,E*-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2008) 52(5): 1859–1861.

Schulz B., Weber K., Radecke C., Scheer C., Ruhnke M. Effect of different sample volumes on the DNA extraction of *Aspergillus fumigatus* from whole blood. *Clinical Microbiology and Infection* (2009) 15(7): 686-688.

Weber K., Schulz B., Ruhnke M. Resveratrol and its antifungal activity against *Candida* species. *Mycoses* (2011) 54(1): 30-33.

White P.L., Bretagne S., Klingspor L., Melchers W.J., McCulloch E., Schulz B., Finnstrom N., Mengoli C., Barnes R.A., Donnelly J.P., Loeffler J. *Aspergillus* PCR: one step closer towards standardisation. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) 48(4): 1231-1240.

Weber K., Schulz B., Ruhnke M. The quorum-sensing molecule *E,E*-Farnesol-its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. *Yeast* (2010) 27(9): 727-739.

Kofla G., Turner V., Schulz B., Storch U., Froelich D., Rognon B., Coste A.T., Sanglard D., Ruhnke M. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Medical Mycology* (2011) 49(2): 132-142.

Schulz B., Weber K., Schmidt A., Borg-von Zepelin M., Ruhnke M. Difference in virulence between fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* in mouse model. *Mycoses* (2011) 54(5): e522-530.

Schulz B., Knobloch M., Moran G.P., Weber K., Ruhnke M. Influence of doxorubicin on fluconazole susceptibility and efflux pump gene expression of *Candida dubliniensis*. *Medical Mycology* (2012) 50(4): 421-426.

Schulz B., Knobloch M., Weber K., Ruhnke M. Doxorubicin selects for fluconazole-resistant petite mutants in *Candida glabrata* isolates. *International Journal of Medical Microbiology* (2012) 302(3): 155-161.

7 Erklärung

Ich, Bettina Schulz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von Doxorubicin auf das ABC-Transporter-vermittelte Resistenzverhalten gegen Fluconazol bei *Candida*-Spezies“ 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

Dipl.-Ing. (FH) Bettina Schulz

8 Danksagung

Mein Dank gebührt zuallererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Ruhnke, der mich immer gefördert und gefordert hat. Ihm verdanke ich neben vielen Dingen meine umfangreiche Publikationsliste und meine Kongresserfahrung. Für die letzten beiden Jahre möchte ich mich besonders bedanken. Obwohl ich Berlin im Jahr 2010 verließ, war Prof. Ruhnke immer für mich da.

Die Arbeit an und für meine Dissertation wäre ohne die Unterstützung meiner Kolleginnen und Kollegen nicht möglich gewesen. Ich möchte zuerst Clarissa Radecke für die hervorragende technische Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit danken. Wenn ich sie gebraucht habe, war sie immer da, vor allem auch in den letzten beiden Jahren.

Meinem Kollegen Kai Löster (geb. Weber) bin ich unendlich dankbar für die vielen Diskussionen und Anregungen, sein offenes Ohr für all meine Probleme, die vielen Stunden im Labor und im Büro und für die Freundschaft, die daraus entstanden ist!

Einen besonderen Dank möchte ich Mathias Knobloch aussprechen. Er hat mich im Rahmen seiner Doktorarbeit ein Stück begleitet und mich tatkräftig unterstützt. Unsere vielen Gespräche haben mir oft neue Perspektiven eröffnet und die Zusammenarbeit hat immer sehr viel Spaß gemacht.

Mein Mann Christian Schulz war all die Jahre meine größte mentale Stütze. Vielen Dank für deine unendliche Geduld, dein Glaube an mich und für die vielen Stunden und Wochenenden, die ich nicht mit dir verbracht habe, um an der Dissertation zu arbeiten. Du hast mich immer wieder aufgebaut und mir die nötige Kraft gegeben, trotz privater Schicksalsschläge und meinem Vollzeitjob, die Arbeit voran zu bringen und letzten Endes abzuschließen.

Ein besonders liebevolles Dankeschön geht an meine Eltern. Auch ihr habt immer an mich geglaubt und mich trotz schwerer Zeiten unterstützt! Euer Stolz auf mich hat mir Kraft gegeben, diesem letztlich auch gerecht zu werden und die Arbeit erfolgreich zu beenden.