

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Lehrstuhl für medizinische Mikrobiologie und Mykologie
der Universität Würzburg
Leitung: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

Multiresistenzen in klinischen *C. glabrata* Isolaten



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Hannah Wilhelm
aus Augsburg

Koblenz, April 2023

Referent: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Urs Müller-Richter

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2023

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Candida glabrata</i>	2
1.2	Antimykotika	4
1.2.1	Azole	5
1.2.2	Amphotericin B	6
1.2.3	Echinocandine	7
1.2.4	Resistenzen	8
1.3	Besonderes Resistenzverhalten von zwei klinischen Isolaten: CG22 und CG56	9
1.4	Sterolsyntheseweg	11
1.5	Antifungale Resistenztestung	13
1.6	Ziele dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Verwendete klinische <i>C. glabrata</i> -Isolate	15
2.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	DNA-Isolation	17
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.3	Gelelektrophorese, Aufreinigung und Sequenzierung	20
2.2.4	Micronaut-AM (Merlin Bruker)	20
2.2.5	YEASTONE	22
2.2.6	Epsilometertest (Etest)	25
2.2.7	RNA-Isolation	26
2.2.8	Bioanalyser-Analyse der RNA	27
2.2.9	Reverse Transkription gefolgt von quantitativer PCR (RT-qPCR)	28
2.2.10	Sterolanalyse	30
2.2.11	Stresstestungen	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Resistenzverhalten der klinischen <i>C. glabrata</i> Isolate CG56 und CG22	32
3.2	Verhalten des klinischen <i>C. glabrata</i> Isolats CG56	34
3.2.1	Wachstum auf Chromagar	35
3.2.2	Verhalten von 10 Einzelkolonien in Resistenztests: Micronaut AM, Etest	35
3.2.3	Analyse der FKS Sequenzen	39
3.3	Genomsequenzierung von CG56 und CG22	41
3.4	Verifizierung der Mutationen in CG22	42
3.5	Sterolanalyse	44
3.6	Genexpression verschiedener klinischer <i>C. glabrata</i> Isolate	47
3.6.1	<i>FKS1</i> und <i>FKS2</i> Expression verschiedener <i>C. glabrata</i> -Isolate	48
3.6.2	Expression der <i>ERG</i> -Gene verschiedener <i>C. glabrata</i> Isolate	50

3.6.3	Genexpression von <i>C. glabrata</i> -Mutante <i>upc2BΔ</i>	52
3.6.4	Veränderungen der Expression nach Kultivierung mit Anidulafungin	54
3.7	Stresstestung verschiedener klinischer <i>C. glabrata</i> Isolate	58
3.7.1	Verhaltenstestung bei verschiedenen Stressmediatoren	59
3.7.2	Verhaltenstestung bei doppelter Stressexposition	61
4	Diskussion	65
4.1	<i>FKS</i> -HS Mutationen im Zusammenhang mit Echinocandin-Resistenzen	66
4.1.1	Ausschluss Mischkolonie der klinischen Probe des CG56	66
4.1.2	Genomsequenzierung: Ergebnisse der <i>FKS</i> -Gene	67
4.1.3	Genexpression <i>FKS1/FKS2</i>	68
4.2	Sterolsynthesepathway als Angriffspunkt für Antimykotika	71
4.2.1	Der veränderte Sterolsynthesepathway	72
4.3	Wirkmechanismus Amphotericin B: Schwammtheorie/Porentheorie	74
4.4	Target Alteration: Veränderungen der Angriffspunkte durch Mutationen oder Hochregulierungen der Zielgene	75
4.5	<i>ERG</i> -Gene im Zusammenhang zu Amphotericin B-Resistenz und Sterolzusammensetzung	77
4.6	Zusätzliche Stressmediatoren ohne Auswirkung auf Amphotericin B-resistente Stämme	78
4.7	Ausblick	79
4.8	Schlussfolgerung	80
5	Zusammenfassung	81
	Literatur	82
	Anhang	
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	
V	Danksagung	
VI	Lebenslauf Hannah Wilhelm	
VII	Eigene Veröffentlichungen	

1 Einleitung

Invasive Infektionen durch *Candida* (*C.*) Spezies (*spp.*) sind eine zunehmende Gefahr für schwerkranke, immunsupprimierte Menschen und sind erheblicher Grund für steigende Morbidität und Mortalität.^[1, 2] *Candida* Spezies gehören als Kommensale zur normalen Mikroflora eines gesunden Menschen und können im Mund, Gastrointestinaltrakt, der Vagina und auf der Haut gefunden werden.^[3] Der Hauptfaktor der steigenden Infektionszahlen, ausgelöst durch Pilzinfektionen ist die stetig steigende Zahl an vorerkrankten und immunsupprimierten Menschen mit sehr hohem Alter. Hauptsächliche Risikofaktoren sind Immunsuppression durch Infektionen wie HIV, medizinische Behandlungen (längere Antibiotika-Therapie, Chemotherapie) oder angeborene Defekte des Immunsystems. Auch die steigende Lebenserwartung trägt zu vermehrten Pilzinfektionen bei, da das Immunsystem im hohen Alter anfälliger ist.^[4, 3] Vor allem intravenöse Katheter, rein parenterale Ernährung, invasive Behandlungen und die Gabe von Breitbandantibiotika tragen dazu bei, dass die Zahl der Infektionen steigt.^[3, 5] In den meisten Fällen wird eine Candidämie opportunistisch ausgelöst durch das natürliche Vorkommen der Pilze in bestimmten anatomischen Regionen, welche auf einen geschwächten Wirt treffen und letale Schäden auslösen können.^[3] Candidosen weisen ein manigfaltiges Symptomspektrum auf und können sich von mukokutanen Wucherungen bis hin zu Blutstrominfektionen (Candidämien) darstellen.^[1] Allein in Frankreich wurden von 2001 bis 2010 36000 Fälle gemeldet, die zu einer Hospitalisierung durch Pilzkrankungen führten, wovon 43% durch Candidosen ausgelöst wurden.^[6] Dennoch werden schätzungsweise die Hälfte der Infektionen erst nach dem Tod eines Patienten festgestellt und sind vor allem auf den Intensivstationen ein immer größer werdendes Problem.^[7] Auch eine exogene Übertragung durch das Pflegepersonal, kontaminierte Katheter und intravenöse Lösungen führen zu einer steigenden Inzidenz von Infektionen.^[8] Bereits in den 1980er Jahren waren Pilzinfektionen ein Hauptauslöser für nosokomiale Infektionen, die vor allem immunkompromierte Patienten betraf oder jene, die bereits eine lange Zeit hospitalisiert waren.^[3, 9] Auch die seit 2020 weltweit herrschende Sars-CoV-2 Pandemie zeigt, dass *Candida*-Coinfektionen vor allem auf Grund der langen Verweildauer der Patienten auf den Intensivstationen ein erhöhtes Risiko darstellen.^[10, 11]

1.1 *Candida glabrata*

Die Liste der *Candida* Spezies, die in menschlichen Infektionen nachgewiesen werden konnten, umfasst bis zu 30 verschiedene Spezies und wird stetig länger. [12] Neben *C.albicans*, der 40% der Infektionen ausmacht und der am besten untersuchte Hefekeim ist, ist *C. glabrata* die zweithäufigste Ursache für Candidosen. [13, 12, 14] Häufig wird *C.albicans* als Grundlage für das Verständnis anderer *Candida* Spezies verwendet, dennoch zeigen sich erhebliche Unterschiede zwischen den Pilzen. Allerdings ist der Genus *Candida* phylogenetisch. So ist *C. glabrata* nur ein entfernter Verwandter von *C.albicans* und ähnelt der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) häufig. [12, 15] So ist *C. glabrata* näher verwandt mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* als mit *C.albicans*. *S. cerevisiae* ist der bekannteste Hefepilz der Welt aufgrund seiner wichtigen Rolle beim Backen und Bierbrauen. Hierbei handelt es sich auch um die erste eukaryotische Spezies, deren gesamtes Genom sequenziert wurde. [16] Dennoch bestehen auch drastische Unterschiede zwischen den beiden Pilzspezies *C. glabrata* und *S. cerevisiae*. *C. glabrata* wurde das erste mal vor etwa 100 Jahren in menschlichem Stuhl nachgewiesen und von Anderson *Cryptococcus glabratus* genannt. [17] Viele Jahre wurde *C. glabrata* für einen nicht-pathogenen Saprophyt der menschlichen Darmflora gehalten, bis er 1980 als Ursache für mukosale und invasive Candidämien identifiziert werden konnte. [13] Zusätzlich konnten Proben von *C. glabrata* von nicht-menschlichem Ursprung gewonnen werden, wie von Kaffeebohnen oder aus verschiedenen Vogelspezies. [18] Auch auf den Oberflächen von Händen und Mobiltelefonen von medizinischem Pflegepersonal kam *C. glabrata* vor. [19] Die große Vielfalt der Nischen, in denen *C. glabrata* nachgewiesen werden kann, deuten darauf hin, dass *C. glabrata* ein Passagier ist. Dieser nomadische Lebensstil könnte eine Erklärung dafür liefern, dass *C. glabrata* sich gut an Umgebungen anpassen kann und eventuell doch kein stark spezialisierter kommensaler Keim ist, sondern ein opportunistischer Kolonisierer. [19] Neben seiner Entstehung fällt *C. glabrata* vor allem durch seine phenotypischen und genetischen Charakteristika auf, da er beispielweise haploid ist [12] und auch nicht in der Lage ist, Pseudohyphen zu erzeugen, wie es sonst bei *Candida* Spezies üblich ist. [13] Genomische Untersuchungen zeigten, dass *C. glabrata* eine größere genetische Vielfalt im Vergleich zu *C.albicans* aufweist, aber keine offensichtliche geographi-

sche Struktur in der genetischen Vielfalt zu erkennen ist. [19, 20] Zusätzlich ist das Genom von *C. glabrata* sehr dynamisch und möglicherweise in der Lage, sein Genom regelmäßig als Antwort auf gewisse selektive Einflüsse [12] umzugestalten. Daher ist es vor allem in Anbetracht sich ausbreitender multiresistenter Stämme eine ernstzunehmende Bedrohung. [19] *C. glabrata* Isolate weisen häufig Resistenzen gegen Azole auf und zeigen eine immer häufiger auftretende Tendenz zur Ausbildung von Echinocandin-Resistenzen. [12, 21, 14] So verdoppelte sich die Echinocandin-Resistenzrate in den Vereinigten Staaten von 4,9% auf 12,3% im Zeitraum von zehn Jahren. [21, 15] Amphotericin B bleibt somit Therapeutikum der Wahl bei *C. glabrata* Infektionen, die weder mit Echinocandinen oder Azolen behandelt werden konnten. Es gibt wenig bekannte *C. glabrata* Stämme, die eine Minimale-Hemm-Konzentration (MHK) >1 mg/L für Amphotericin B aufweisen und hiergegen resistent sind. Wegen der massiven Nebenwirkungen gilt es jedoch nicht mehr als Erstlinientherapeutikum. [9, 22] Zu den akuten Nebenwirkungen, die bei 80% der Patienten nach Amphotericin B Gabe vorkamen zählen Fieber, Übelkeit und Kopfschmerzen. Zusätzlich trat bei 30% der Patienten eine eingeschränkte Nierentätigkeit auf. [23] Hauptauslöser der Nierentoxizität ist die Affinität von Amphotericin B zu Cholesterin. Dies führt zu Poren in renalen Membranen und kann somit potenziell fatale Dysfunktionen auslösen. [24, 25]

1.2 Antimykotika

Obwohl die Zahl der *Candida*-assoziierten Infektionen stetig zunimmt, wurde im letzten Jahrzehnt nur ein einziges neues antifungales Medikament zugelassen. [26] Abb. 1 zeigt den zeitlichen Ablauf der Einführungen, der auf dem Markt vorhandenen Antimykotika und soll die drastische Stagnation der Weiterentwicklung darstellen.

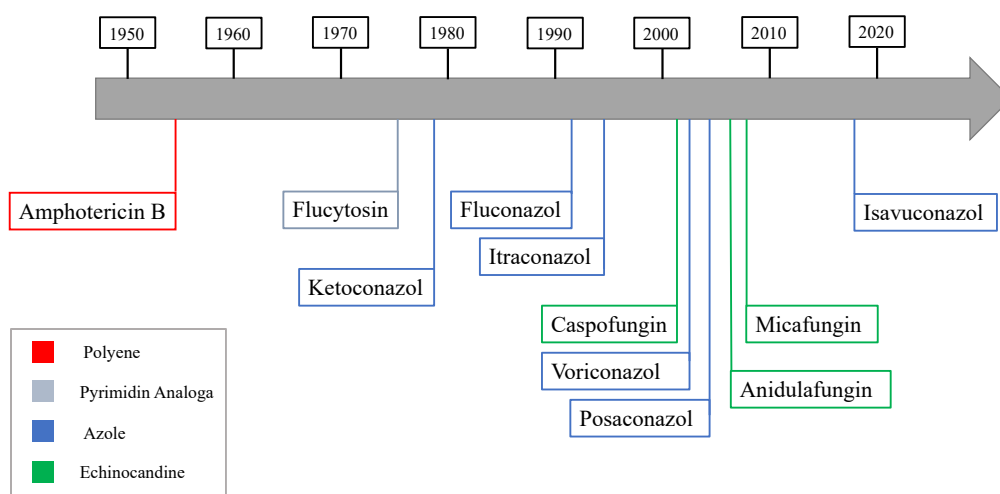


Abb. 1 Zeitliche Darstellung der Neueinführungen von Antimykotika zur Behandlung invasiver Candidosen im Zeitraum von 1950 bis 2020. Modifizierte Abbildung nach Lilienfeld-Toal et al. [7]

1.2.1 Azole

Das Prinzip des Wirkmechanismus der Azole beruht auf der Hemmung des Cytochrom P-450 Enzyms in Pilzorganismen. Cytochromenzyme sind Bestandteile in fast allen lebenden Zellen wie in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Insekten. Die Cytochromenzyme beinhalten Eisen Protophoryrin IX- Proteine und spielen eine maßgebliche Rolle in der Interaktion vieler wichtiger Bestandteile, wie Sterolen, Steroiden, Phenolen, Alkenen und weiteren Stoffen. Das Hauptenzym, das von Azolen gehemmt wird ist 14-alpha-Demethylase, das für die Umwandlung von Lanosterol zu Ergosterol zuständig ist. [27] Ergosterol ist ein Hauptbestandteil der Zellmembran und beliebter Angriffspunkt für Antimykotika aus der Gruppe der Azole und der Polyene. [28] Des Weiteren unterbinden Azole die Synthese von Ergosterol. Dadurch verändert sich die Membranfluidität der Pilze und sorgt für Ausfälle der Vitalprozesse wie Signaltransduktion, Transportation, Exozytose und Endozytose. [29] Alle Gene, die in die Biosynthese von Ergosterol involviert sind werden in Anwesenheit von Azolen hochreguliert. Besonders *ERG11* (bei anderen Spezies wie *Aspergillus* als *CYP51* bekannt) ist in die Umwandlung von Lanosterol zu 4,4-Dimethylcolesta-8,14,24-trienol beteiligt und gilt als Hauptfaktor der Hochregulierung der Ergosterolsynthese als Antwort auf Azole und wird somit bei *C. glabrata* als eine Ursache für die Entstehung von Resistenzen gesehen. [30] Viele Mechanismen für Azolresistenzen wurden bereits in *C.albicans* identifiziert. Hierzu zählen die Steigerung der Expression von Multidrug-Transportern (kodiert von *CDR1*, *CDR2* und *MDR1*), Mutationen in Lanosterol-Demethylase und erhöhte Expression von *ERG11*. [31] Weitere Studien zeigten den Zusammenhang der Hochregulierung von *ERG*-Genen und Azolresistenzen in *C.albicans* sowie in *S.cerevisiae*. [32] Die Azol-Resistenz in *C. glabrata* wird hauptsächlich durch Mutationen im Gen *PDR1* vermittelt, welches für einen Schlüsselregulator der Transkription der *ERG*-Gene kodiert. [33] Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus gegen Azole vor allem in *C.albicans* ist eine Mutation in *ERG11*. [34] Bei anderen Candida-Arten wird die Azolresistenz mit mutierten Formen des Transkriptionsfaktors Upc2 in Verbindung gebracht, der eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Expression von Genen spielt, die für Enzyme kodieren, die am Ergosterol-Biosyntheseweg beteiligt sind. [35] Azole weisen eine sehr geringe Toxizität auf und haben eine generell verminderte

fungizide Aktivität. So beinhaltet die Therapie eine relativ lange Verabreichungszeit, die zusätzlich zu einer immer häufigeren Verabreichung von Azolen der Ursprung vermehrt auftretender Resistenzen zu sein scheint. [31] Qingdi et al. zeigten, dass die Hemmung der Sterolsynthese durch Azole die Expression von Steroltransportergenen steigert und zu einer vermehrten Sterolaufnahme auch in *C. glabrata* führten. [36]

1.2.2 Amphotericin B

Amphotericin B (AMB) ist ein Breitband-Antimykotikum [26] und gehört zur Antimykotikaklasse der Polyene, die direkt am Ergosterol der Zellmembran angreifen und die Zellwandpermeabilität zerstören. Amphotericin B bindet mit einer zehnfach erhöhten Affinität an Ergosterol, dem Sterol der Pilzmembran, als an Cholesterin, das menschliche Membransterol, und zeigt somit eine selektive antimykotische Aktivität. [37] Aufgrund von nierentoxischen Nebenwirkungen ist Amphotericin B inzwischen nur als Zweitlinientherapie empfohlen. [20, 38]. Die Grundlage der Nierentoxizität liegt an der Bindung von freiem Amphotericin B an das Cholesterin der renale Membran, das zu Porenbildung führt und somit ein Ungleichgewicht des Elektrolythaushaltes und Verlust von ATP auslöst. [24] Obwohl Amphotericin B in oralen Formen erhältlich ist, wird es aufgrund seiner geringen Löslichkeit im Magen-Darm-Trakt nur minimal aufgenommen, deswegen wird oral verabreichtes Amphotericin B in der klinischen Praxis nicht häufig eingesetzt und ist in der Regel nur für die Behandlung von lokalisierten oralen oder gastrointestinalen Pilzinfektionen reserviert. [39] Um die Löslichkeit von Amphotericin B zu erhöhen, wurden verschiedene Formulierungen entwickelt, einschließlich liposomaler und lipidbasierter Formulierungen, die die Bioverfügbarkeit verbessert und die Toxizität reduziert haben. [39, 24] Der genaue Wirkmechanismus von Amphotericin B ist seit Jahren ungeklärt. Obwohl es gut etabliert ist, dass Amphotericin B zunächst an das Ergosterol der Membran bindet und Poren bildet, gibt es mittlerweile zahlreiche Artikel, die darauf hinweisen, dass eine erhöhte Permeabilität möglicherweise nicht der einzige Mechanismus ist, der für die tödliche Wirkung des Moleküls verantwortlich ist. [40, 38]

1.2.3 Echinocandine

Auf Grund sehr geringer Nebenwirkungen und eines breiten Wirkspektrums gegen *Candida* Spezies werden Echinocandine in der Regel als Erstlinientherapeutika gegen Candidosen eingesetzt. [38, 21, 41] Echinocandine hemmen die 1,3-beta-D-Glucan-Synthase (GS), in dem sie auf die FKS Untereinheiten der GS zielen, die durch die Gene *FKS1*, *FKS2* und *FKS3* kodiert werden. [21, 41] Für die Zellwandintegrität ist das *FKS2*-Gen erforderlich, das für eine stressinduzierte alternative Untereinheit der Beta-1,3-Glucan-Synthase kodiert, die das Ziel von Echinocandin-1,3-beta-Glucan-Synthase-Inhibitoren ist. [42] Somit wird die Biosynthese von 1,3-beta-D-Glucan unterbrochen, womit ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran fehlt. Dies wiederum führt zu einer defekten Membran, Instabilitäten und Lyse der Hefezellen und somit zum Zelltod. [41] Der Angriffspunkt der Echinocandine Glucan existiert in Säugetierzellen nicht, weswegen die Toxizität von Echinocandinen minimal bleibt. [37] Mutationen in Genen, die für Elemente des 1,3-beta-D-Glucan Synthase Komplex kodieren, werden mit Echinocandin-Resistenzen bei verschiedenen *Candida* Spezies. assoziiert. [43, 20, 21] Punktmutationen in zwei Hotspot-Regionen (HS1 und HS2) des *FKS1* Gens und bei *C. glabrata* ebenfalls in *FKS2* konnten in Verbindung zu einer verminderten Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber Echinocandinen gebracht werden. [44] Auch Aldejohann et al. konnten bestätigen, dass 97% der für die Echinocandin-Resistenz relevanten Mutationen in den HS1-Regionen der beiden *FKS*-Genen liegen. [45] Die *FKS* Gene kodieren für die wichtigste Untereinheit der 1,3-beta-D-Glucan-Synthase. [46] Dieser Resistenzmechanismus konnte in *C.alibcans* und Nicht-albicans *Candida* Spezies demonstriert werden. [41]

FKS-Mutationen korrelieren nicht nur mit höheren *in vitro* MHKs sondern auch mit häufigerem Therapieversagen und einer erhöhten Mortalität *in vivo*. [15, 21] Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sowie das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) veröffentlichten jeweils klinische Breakpoints (CBPs) der minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) für die Echinocandine Anidulafungin(AND), Caspofungin (CSF) und Micafungin (MCF) zur maximalen Erkennung von *FKS*-mutierten Stämmen unter klinischen Isolaten. [47, 21]

1.2.4 Resistenzen

Antimykotische Resistenz kann als mikrobiologische oder klinische Resistenz definiert werden, oder als eine Kombination aus diesen beiden. [48] Mikrobiologische Resistenz liegt vor, wenn es zu einer Wachstumshemmung des Pathogens bei einer Konzentration, die höher liegt als es bei Wildtyp-Stämmen zu beobachten ist, kommt. Klinische Resistenz bedeutet, dass der infizierende Organismus bei einer Antimykotika-Konzentration gehemmt wird, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Therapieversagen führt, da es sich um zu hohe Konzentrationen handelt, die nicht unter sicherer Dosierung verabreicht werden können. [43] *Candida* Isolate, die resistent gegen zwei oder drei Antimykotika sind, limitieren die Therapieoptionen drastisch. Deswegen sind eine schnelle Identifikation der Spezies, Empfindlichkeitsprüfungen der Antimykotika und die Entwicklung neuer Medikamente zwingend notwendig, um die Sterblichkeitsrate durch Candi-dämien reduzieren zu können. [9]

1.3 Besonderes Resistenzverhalten von zwei klinischen Isolaten: CG22 und CG56

Aldejohann et al. führten eine systematische Analyse hinsichtlich Echinocandin- und Fluconazol-Resistenz von 176 *C. glabrata*-Isolaten durch, die dem Nationalen Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) zwischen 2015 und 2019 zugesandt wurden. [45] Die Stämme wurden zunächst mittels Mikrodilution nach EUCAST Standards auf ihr Verhalten gegen Anidulafungin analysiert. Anschließend wurde nach DNA-Isolation und Polymerasekettenreaktion eine *FKS*-Sequenzierung durchgeführt. Die Stämme konnten mittels ihrer MHK und dem Vorliegen von *FKS*-Mutationen, wie Abb. 2 zeigt, eingeteilt werden. Hierbei konnten zwei Echinocandin-resistente Stämme identifiziert werden, die nach wiederholter Testung eine Resistenz gegen Anidulafungin zeigten und keine Mutation in den *FKS1* und *FKS2* Hotspot-Regionen (HS1 und HS2) nachwiesen. [45] Diese mehrfach getesteten Stämme stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit und sollen genauer untersucht werden. Die Leitfrage lautet ob es sich hierbei um eine extreme Version eines Borderline-Phänotyps handelt oder ein anderer Resistenzmechanismus zugrunde liegt, der zu dem Auftreten dieser Multidrug-resistenten (MDR) Stämmen führt. Der Borderline-Phänotyp bezieht sich auf einen Zustand, in dem das Wachstum eines Mikroorganismus in Anwesenheit einer bestimmten antimikrobiellen Substanz beeinträchtigt wird, aber nicht ausreichend ist, um als resistent eingestuft zu werden. [45, 49] Die beschriebenen zwei Stämme werden mit ihren Abkürzungen CG22 und CG56 benannt und sind in Abb. 2 rot gekennzeichnet.

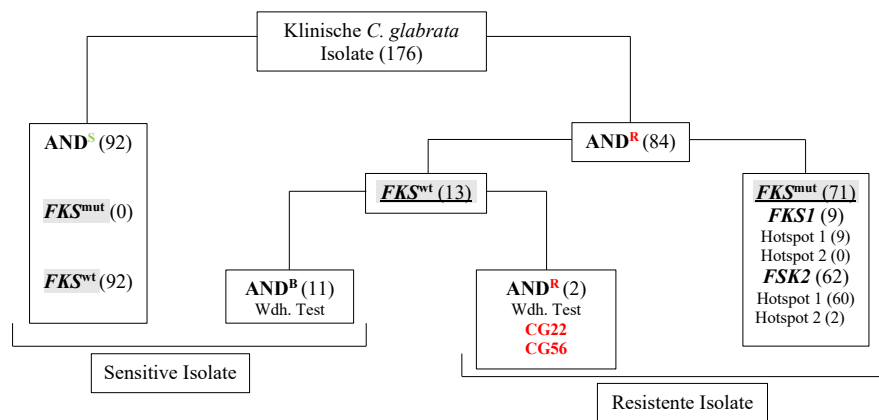


Abb. 2 Testung der Klinischen *C. glabrata*-Isolate auf FKS-HS-Mutation in Kombination mit Anidulafunginresistenz. Die modifizierte Abbildung nach Aldejohann et al. [45] zeigt den Ablauf der Testungen von 176 Isolaten und fasst die Ergebnisse der Resistenztestung und der Analyse nach Mutation in den *FKS*-Genen zusammen. AND = Anidulafungin, S= Sensitiv, mut= Mutation, wt= Wildtyp, R= Resistent, B= Borderline.

1.4 Sterolsyntheseweg

Innerhalb der verfügbaren Wirkstoffe für eine antifungale Therapie, sind jene, deren Angriffspunkte die Zellmembran oder die Ergosterol-Synthese sind, die am besten erforschten. Die Ergosterol-Biosynthese ist das Angriffsziel der heute noch vielseitigen und sehr wirksamen Antimykotika: der Azole. Neben Azolen zielen auch andere Substanzklassen wie Allylamine und Morpholine auf die Ergosterol-Synthese ab. [50] Auch die Polyene Amphotericin B (AMB) und Nystatin (NYS) binden an das Ergosterol der Zellmembran, um ihre antifungale Wirkung zu entfalten. Ergosterol ist der Hauptbestandteil der Zellmembran von Pilzen und ein Bioregulator für Membranfluidität, Asymmetrie und Integrität. Ergosterol spielt eine Hormon-ähnliche Rolle in Pilzzellen, die wachstumsstimulierend wirkt. [37, 51] Dieser Syntheseweg ist in Eukaryoten konserviert und führt bei Säugetieren zur Bildung von Cholesterin und bei Pilzen zu Ergosterol. [31] Die Sterol-Biosynthese findet im endoplasmatischen Reticulum (ER) statt und beinhaltet eine Kaskade von 25 biosynthetischen Enzymen. [51] Der Sterol-Biosyntheseweg kann artenspezifisch variieren, um am Ende Ergosterol als Stoffwechselprodukt zu produzieren. [50] Abb. 3 zeigt den Sterol-Biosyntheseweg und die alternativen Stoffwechselabläufe. Die blaue Umrandung beschreibt den meist unter physiologischen Bedingungen ablaufenden Stoffwechselweg. Da Ergosterol nicht in Säugetieren vorkommt, weil diese anstelle dessen Cholesterin bilden, stellt der Ergosterol-Biosyntheseweg einen erfolgreichen und vielversprechenden Angriffspunkt für antifungale Medikamente zur Therapie von Pilzinfektionen beim Menschen dar. [51]

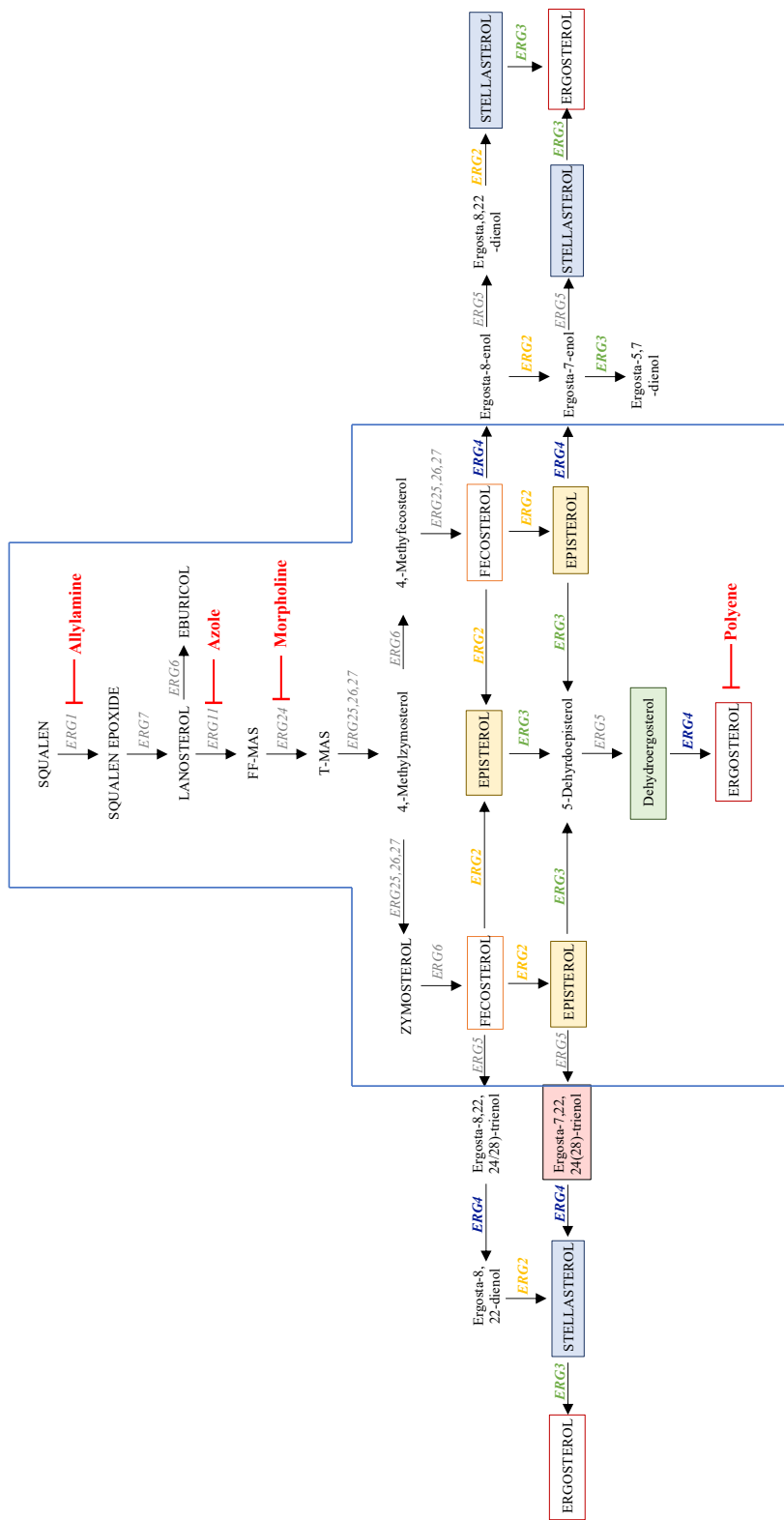


Abb. 3 Modifizierte Abbildung des Sterolsynthesewegs nach Müller et al. [50] In blau eingerahmt wird der physiologisch ablaufende Sterolweg dargestellt. Die notwendigen *ERG*-Gene sind auf den Pfeilen zwischen den Intermediaten angegeben. In Rot sind die Stellen gekennzeichnet, an denen die Antimykotika wirken.

1.5 Antifungale Resistenztestung

Um den Therapierfolg zu optimieren, haben sich verschiedene Testverfahren etabliert, die auch in standardisierten Protokollen relativ schnell eine Aussage zum Resistenzverhalten des klinischen Pilzisolats ermöglichen sollen. Die Mikrodilution beruht auf dem Kultivieren des Stammes für ca. 12h und anschließender Inkubation mit unterschiedlichen Antimykotikakonzentrationen. Diese zunächst sehr aufwändige Methode wurde durch kommerziell vorgefertigte Mikrotiterplatten mit bereits vorbereiteten Antimykotikakonzentrationen vereinfacht. Die MHK, also jene Konzentration eines Antimykotikums, bei der eine genau bestimmte Anzahl von Zellen des getesteten Stammes gerade noch wachsen kann, wird definiert. Intensive Bemühungen um standardisierte antimykotische Empfindlichkeitsprüfungen, die reproduzierbar sind und deren Ergebnisse analysierbar sind, haben zu der Entwicklung des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) geführt. [52] Vor allem die Interpretation der Ergebnisse steht im Mittelpunkt der Bemühungen beider Einrichtungen. Die Definition sogenannter Breakpoints soll vor allem Aussagen über den klinischen Erfolg der Antimykotikatherapie liefern. Der klinische Breakpoint ist der Punkt, an dem eine Substanz als wirksam oder unwirksam eingestuft wird. Er wird als Grenzwert zwischen empfindlichen und resistenten Erregern festgelegt und hilft bei der Entscheidung, welche antimikrobielle Therapie am besten geeignet ist. Beide Referenzsysteme erzeugen vergleichbare Ergebnisse, dennoch ist eine Weiterentwicklung und eine eventuelle Annäherung beider Referenzsysteme sinnvoll. [53] So unterscheiden sich die kommerziellen Testkits nicht nur in ihrer Rezeptur, sondern auch an den Breakpoints, die sich entweder an CLSI oder EUCAST orientieren (z.B. YeastOne an CLSI, Micronaut an EUCAST). Die definierten Breakpoints berücksichtigen die MHK und pharmakokinetische Daten, sowie Tiermodell-Daten und werden für jede Spezies angegeben. [38] Die Einteilung der MHK Werte erfolgt in den Kategorien S (sensibel), I (sensibel, bei Erhöhung der Antimykotikakonzentration) und R (resistent). [54, 55] Anhand dieser Breakpoints können Aussagen über den Therapieerfolg getroffen werden.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das vermehrte Auftreten von Antimykotikaresistenzen und auch das steigende Auftreten multi-resistenter *C. glabrata*-Stämme ist besorgniserregend. Für viele Resistenzmechanismen konnten bereits Erklärungsansätze gefunden werden. Dennoch treten weiterhin klinische Isolate mit einem Resistenzmuster auf, das durch standardisierte Testungen nicht erklärt werden kann. Zwei klinische Stämme, die dem Nationalen Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) zugesandt wurden und in den Analysen von Aldejohann et al. hervorstachen, stehen im Fokus der vorliegenden Arbeit. Hierbei handelt es sich um die Isolate CG22 und CG56, die resistent gegen Anidulafungin waren, aber keine Mutationen in den HS von *FKS1* und *FKS2* aufwiesen. Zusätzlich zu Anidulafungin zeigte CG22 ein Resistenzverhalten gegen Amphotericin B. [45] In der vorliegenden Arbeit sollen die Ursachen für die multiplen Resistenzen der beiden klinischen Isolate intensiv analysiert werden, um neue Erklärungsansätze für Resistenzen bei *C. glabrata* zu finden.

Hierfür werden folgende Aspekte behandelt:

1. Resistenztestung der klinischen Isolate CG22 und CG56, auch in Mehrfachtestung von Einzelkolonien zur Verifizierung des Resistenzverhaltens
2. Sequenzierung der *FKS1* und *FKS2* Gene und zusätzliche Genomsequenzierung von CG22 und CG56
3. Sterolanalyse von CG22 und CG56 und Analyse der *ERG*-Gensequenzen im Vergleich zum sensitiven Referenzstamm CBS138
4. Analyse der Genexpression verschiedener klinischer *C. glabrata* Isolate
5. Testung des Stressverhaltens von resistenten *C. glabrata* Isolaten

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete klinische *C. glabrata*-Isolate

Die in Tabelle 1 gelisteten *Candida*-Stämme wurden für die Versuche zunächst auf YPD-Agarplatten bei 37 °C angezüchtet. Je nach Versuchsaufbau wurden die Stämme in 5 ml YPD-Flüssigmedium bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind den Tabellen 10 und 11 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 1 Für diese Arbeit verwendete *C. glabrata*- Stämme.

Stamm	NRZ ID	Genotyp	Beschreibung	Herkunft	Referenz	<i>FKS</i> -Mutation
CBS138		<i>wildtyp</i>	Referenzstamm	Niederlande	Kitada et al, 1995	Keine (Sensitiv)
CG12	2016-124	<i>wildtyp</i>	Klinisches Isolat	Abdomen	NRZMyk, Jena	<i>F625S (FKS1 HSI)</i>
CG22	2016-252	<i>wildtyp</i>	Klinisches Isolat	BK	NRZMyk, Jena	Keine (Borderliner)
CG40	2015-028	<i>wildtyp</i>	Klinisches Isolat	Abdomen	NRZMyk, Jena	Keine (Sensitiv)
CG56	2017-099	<i>wildtyp</i>	Klinisches Isolat	BK	NRZMyk, Jena	Keine (Borderliner)
CG78	2018-172	<i>wildtyp</i>	Klinisches Isolat	Abdomen	NRZMyk, Jena	Keine (Borderliner)
CG173	2018-380	<i>wildtyp</i>	Klinisches Isolat	Abdomen	NRZMyk, Jena	<i>F659del (FKS2 HSI)</i>

2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien

Tabelle 2 beinhaltet die Puffer, Medien und Lösungen mit der entsprechenden Zusammensetzung, die für die vorliegende Arbeit notwendig waren. Die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind den Tabellen 10, 11 und 12 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 2 Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Medium	Zusammensetzung und Rezeptur
10% SDS	Aus der 20%igen Stocklösung wurde eine 1:2 Verdünnung mit RNase-freiem Wasser erstellt und sterilfiltriert.
1X TAE Puffer	Die vorhandene Stocklösung wurde im Verhältnis 1:50 mit VE Wasser verdünnt.
3M Natriumacetat	81,642g $C_2H_3NaO_2 \cdot xH_2O$ wurden in 100 ml RNase-freiem Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 5,3 eingestellt, mit RNase freiem Wasser bis 200 ml aufgefüllt und autoklaviert.
70% Ethanol, Isopropanol	Die 100%ige Alkohollösungen wurden mit RNase freiem Wasser auf 70% verdünnt.
AE Puffer	Für einen 100 ml Ansatz wurden 1,7 ml Natriumacetat (pH 5,3) mit 2 ml 0,5 EDTA (pH 7) vermischt und mit RNase freiem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert.
Amphotericin B	Die Stocklösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml wurde in 10% DMSO gelöst und die weiteren Verdünnungen wurden mit A. dest abgefertigt.
Anidulafungin	Die vorhandenen Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde mit RNase freiem Wasser auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.
Calcofluor	Der 5 mg/ml Stock wurde in DMSO gelöst.
Congored	Der 10 mg/ml Stock wurde in destiliertem Wasser (A. dest.) gelöst und für weitere Versuche erneut verdünnt.
DTT	Der 1 M DTT Stock wurde mit A. dest. auf die gewünschte Konzentration verdünnt.
Lysispuffer	5 ml Trispuffer (1 M, pH 7,0) mit 15 ml SDS (20%), 10 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) und 70 ml A. dest. vereinen.
Menadion	1 mg/ml Menadion ist in DMSO löslich, und 16 mg/ml in Ethanol. Für die vorliegenden Versuche wurde der 10 mM Menadion Stock mit DMSO gelöst und weiter verdünnt.
Myriocin	Der vorhandene 5 mM Stock wurde mit Methanol auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und bei -20°C gelagert.
SDG	Für 500 ml wurden 10 g Glucose, 3,35 g YNB ohne Aminosäuren vermischt und in 400 ml A. dest. gelöst. Nach der pH-Wert Messung sollte der Wert zwischen 5,4 und 5,5 liegen. Nun wurde nochmals mit A. dest. auf 500 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.
YPD	Für 500 ml Flüssigmedium wurden 10 g Glucose, 10 g Pepton und 5 g Hefeextrakt in 300 ml A. dest. Gelöst und mit HCl auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Danach wurde mit A. dest. auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und das Gemisch sterilfiltriert.
YPD Agar	Für 500 ml Agar werden 10 g Glucose, 10 g Pepton, 10 g Agar und 5 g Hefeextrakt benötigt, die mit A. dest. auf 500 ml aufgefüllt wurden. Danach wurden die Agarplatten autoklaviert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Zur Isolierung von *C. glabrata* DNA wurden jeweils Übernachtskulturen in 5ml YPD-Flüssigmedium angesetzt und bei 37° C im Schüttelinkubator kultiviert. Je 2 ml der Pilzkultur wurden auf Reaktionsgefäße verteilt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl mit RNase A versetztem Lysispuffer resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß mit sterilen Glasperlen gegeben. Nach fünf min Schreddern mit dem Vortexadapter folgte eine einstündige Inkubationsphase bei 68 °C mit gelegentlichem Schütteln auf dem Vortex-Gerät. Darauf wurden die Proben 10 min bei 16000 xg zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol mehrfach invertiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter 10- minütiger Zentrifugation bei 16000 xg folgten zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl Isopropanol (70%). Das Pellet wurde bei Raumtemperatur vollständig getrocknet und in 50 µl A. dest. resuspendiert. Die Langzeitaufbewahrung der DNA-Isolate erfolgte bei -20 °C.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der isolierten genomischen DNA wurden diverse PCR Versuche durchgeführt. Hierfür wurde stets der Q5® High Fidelity 2x Mastermix (New England Biolabs) und der TProfessional Trio PCR Thermocycler (Analytik Jena) verwendet. In den meisten Fällen wurde folgender PCR-Ansatz benutzt, die jeweils benötigten Oligonukleotid-Primer sind der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3 PCR Ansatz

Ansatz für PCR	
1 µl	genomische DNA
1 µl	Primer 1 (10 mM)
1 µl	Primer 2 (10 mM)
22 µl	RNase-freies Wasser
25 µl	Q5® 2x Mastermix

2 Material und Methoden

Das verwendete PCR-Programm wurde an die Temperatur der Primer angepasst und entsprach folgendem Schema:

Tabelle 4 PCR Programm

Zeit	Temperatur
4 min	95 °C
1 min	95 °C
1 min	X °C
2 min	72 °C
10 min	72 °C
∞	10 °C

Neben dem oben genannten PCR-Ansatz wurden auch Kolonie-PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierfür wurde Pilzmaterial, welches mit einer Pipettenspitze von einer YPD Platte entnommen wurde, in 23 μl A. dest. gelöst. Mit einem sogenannten Hot-Start wurde das Pilzzell-Wassergemisch im PCR Thermocycler auf 94 °C erhitzt und nach vier min Primer und Mastermix hinzugefügt. Das Verhältnis 1 μl je Primer und 25 μl Q5® 2x Mastermix wurde beibehalten.

2 Material und Methoden

Tabelle 5 Auflistung der für die PCR verwendeten Oligonukleotid Primer mit ihrer Sequenz in 5'-3'-Orientierung und der entsprechenden Schmelztemperatur in °C

Primer	Sequenz	Schmelztemp.
CgFKS1-HS1-f	CCATTGGGTGGTCTGTTCACG	56.3
CgFKS1-HS1-r	GATTGGGCAAAGAAAGAAATACGAC	54.4
CgFKS1-HS2-f	GGTATTTCAAAGGCTCAAAGGG	53.5
CgFKS1-HS2-r	ATGGAGAGAACAGCAGGGCG	55.9
CgFKS2-HS1-f	GTGCTCAACATTTATCTCGTAGG	53.5
CgFKS2-HS1-r	CAGAATAGTGTGGAGTCAAGACG	55.3
CgFKS2-HS2-f new	CTAAGATTGGTGCAGGTATGG	52.4
CgFKS2-HS2-r new	AGAACAGTAAAGCAGATAGAGATG	52.3
CgFKS1-Seq1f	AGGGTCTTTTCGAATCTTGCTATTAATTC	55.9
CgFKS1-Seq1r	CGACCGTCGACAATTCGTAGAC	57.1
CgFKS1-Seq2f	CTATGCCAACAGAGAACCGAGC	56.7
CgFKS1-Seq3f	GAGAACTTTGAGAGCCCCAACT	54.8
CgFKS1-Seq3r	CACGTAATAGGGCATTTCATACCG	55.3
CgFKS1-Seq4r	CACATACCGAACAATGGACCAGA	55.3
CgFKS1-Seq5f	AGCTCCTCTCCTATGGTTCTGG	56.7
CgFKS1-Seq5r	TCTTGATGTAGTATGGAGGTAAATGATG	55.5
CgFKS2-Seq1f	ACTGCCTAACTTCCCCTTGTGC	57.1
CgFKS2-Seq1r	CTGTTCTCTGTTGGCATAATGGTGA	56.0
CgFKS2-Seq2f	ATCTGGGGTGAAGCTAACCAAG	54.8
CgFKS2-Seq2r	ACTTTGAACCCACCAATACTCAC	55.7
CgFKS2-Seq3f	CAGAATTTTATCAACTACTACCATGAG	53.7
CgFKS2-Seq3r	CTTCCAAATAGTTGTCTTGTTAGCAT	55.2
CgFKS2-Seq4f	TGGTAACCCTATTCTTGGTGATGGT	56.0
CgFKS2-Seq5f	GATCTATGCTGATGTTATTATTCGGTACAG	57.5
CgFKS2-Seq5r	AGGATAAAATGATAGTTGAAAGAGTAATGATGC	56.9
G1-CgERG3	CTACGAGAACAAGAGCTAAGAGTAT	54.4
G4-CgERG3	GATGTAGGAAAAGTAATGTGTGCG	54.0
G1-CgERG4	GTATCCGAGGAAGGTCGCTC	55.9
I2-CgERG4	AGTAAGCTGTTAGAAGGACCACGTA	56.0
G4-CgERG4	CTTCGGTTGCAGTGAGATTTGAAT	54.0
I1-CgERG4	GAGCTCCATTGAACCCTAGATG	54.8

2.2.3 Gelelektrophorese, Aufreinigung und Sequenzierung

Zur Verifizierung wurden die PCR Produkte mittels Gelelektrophorese sichtbar und auswertbar gemacht. Hierfür wurden 1%ige Agarosegele verwendet, die aus TAE Puffer und Agarosepulver im richtigen Verhältnis (50 ml 1x TAE Puffer und 50 mg Agarose) bestanden. Das Pulver wurde im Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Flüssigkeit entstand, woraufhin diese mit 2,5 μ l Midori Green Advance versehen wurde. Nach kurzer Abkühlzeit wurde das Agarosegel in die vorbereitete Form gegossen, ein Kamm mit Aussparungen für die Proben eingesetzt und ausgehärtet. Pro Tasche im Gel wurden 5-50 μ l PCR Produkt zusammen mit Ladepuffer eingefügt und für eine Stunde bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Um das Ergebnis visualisierbar zu machen, wurde das Gel in eine UV-Kammer gelegt und fotografisch festgehalten. Zeigte sich in der Gelelektrophorese die gewünschte Bande, wurden die PCR Produkte mittels eines Aufreinigungs-Kits, wie vom Hersteller (Macherey-Nagel Nucleospin Gel and PCR clean up) beschrieben, gewaschen und in 30 μ l Elution Buffer oder A. dest. gelöst. Um die PCR Produkte sequenzieren zu lassen, wurden jeweils 10 μ l des aufgereinigten Ergebnisses mit jeweils 2 μ l Primer (10 pM/ μ l) (Tab. 5) und 2 μ l A. dest. in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und an LGC Genomics GmbH (Berlin), versandt.

2.2.4 Micronaut-AM (Merlin Bruker)

Mikrodilutionstestungen mittels Micronaut wurden durchgeführt, um die Empfindlichkeit der *C. glabrata* Isolate gegenüber verschiedener Antimykotika gemäß der EUCAST-Richtlinien zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde vor allem die Mehrfachtestung des gleichen Stammes CG56 in zehn Einzelkolonien durchgeführt, um zu differenzieren, ob ein einheitliches Verhalten beobachtbar war oder ob eventuell eine Mischkultur vorlag. Der Micronaut-AM besteht aus einer standardisierten Mikrotiterplatte, in deren Kavitäten bereits unterschiedliche Antimykotikakonzentrationen vorgelegt sind. Nach Vorwärmen des RPMI Mediums des Micronaut AM wurde dem Medium zunächst der Farbstoff AST-Indikator und Methylenblau beigelegt, um ein visuelles Ablesen zu ermöglichen. Nach Verdünnung der Hefesuspension in 2 ml A. dest. und Einstellung von 0,5 McFarland mittels Densitometer wurden 10 μ l der Zellverdünnung zum

2 Material und Methoden

RPMI-Farbansatz gegeben und jeweils 100 μl der Suspension in die 96-well Platte pipettiert. Zur Kontrolle wurden 10 μl der Negativkontrolle aus Well A1 mit 50 μl A. dest verdünnt und auf YPD Agar ausplattiert. Die Micronautplatten wurden mit einer Klebeschutzfolie verschlossen und bei 37 °C für 24 h im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurde die Einsaatkontrolle ausgezählt und die Testplatten fotografisch festgehalten. Das visuelle Auswertschema erfolgte nach Farbumschlag: blau= kein Wachstum, pink= Wachstum, farblos= starkes Wachstum.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC	AMB 16	AMB 8	AMB 4	AMB 2	AMB 1	AMB 0,5	AMB 0,25	AMB 0,125	AMB 0,063	AMB 0,031	ITR 4
B	NGC	SFC 32	SFC 16	SFC 8	SFC 4	SFC 2	SFC 1	SFC 0,5	SFC 0,25	SFC 0,125	SFC 0,063	ITR 2
C	FCL 128	FCL 64	FCL 32	FCL 16	FCL 8	FCL 4	FCL 2	FCL 1	FCL 0,5	FCL 0,25	FCL 0,125	ITR 1
D	VOR 8	VOR 4	VOR 2	VOR 1	VOR 0,5	VOR 0,25	VOR 0,125	VOR 0,063	VOR 0,031	VOR 0,016	VOR 0,008	ITR 0,5
E	POS 8	POS 4	POS 2	POS 1	POS 0,5	POS 0,25	POS 0,125	POS 0,063	POS 0,031	POS 0,016	POS 0,008	ITR 0,25
F	MIF 8	MIF 4	MIF 2	MIF 1	MIF 0,5	MIF 0,25	MIF 0,125	MIF 0,063	MIF 0,031	MIF 0,016	MIF 0,008	ITR 0,125
G	ANF 8	ANF 4	ANF 2	ANF 1	ANF 0,5	ANF 0,25	ANF 0,125	ANF 0,063	ANF 0,031	ANF 0,016	ANF 0,008	ITR 0,06
H	CAS 8	CAS 4	CAS 2	CAS 1	CAS 0,5	CAS 0,25	CAS 0,125	CAS 0,063	CAS 0,031	CAS 0,016	CAS 0,008	ITR 0,03

Abb. 4 Schematische Darstellung der Plattenbelegung der 96-Well Platte des Micronaut AM. Abgebildet wird in horizontaler Richtung der Konzentrationsgradient der verschiedenen Antimykotika mit zusätzlicher Wachstumskontrolle (GC), sowie Negativkontrolle (NGC). A2-A11: AMB= Amphotericin B, B2-B11: 5FC= 5-Fluorocytosin, C1-C11: FCL= Fluconazol, D1-D11: VOR= Voriconazol, E1-E11: POS= Posaconazol, F1-F11: MIF= Micafungin, G1-G11: ANF= Anidulafungin, H1-H11: CAS= Caspofungin, 12A-12H: ITR= Itraconazol. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Konzentrationsangaben in $\mu\text{g/ml}$.

2 Material und Methoden

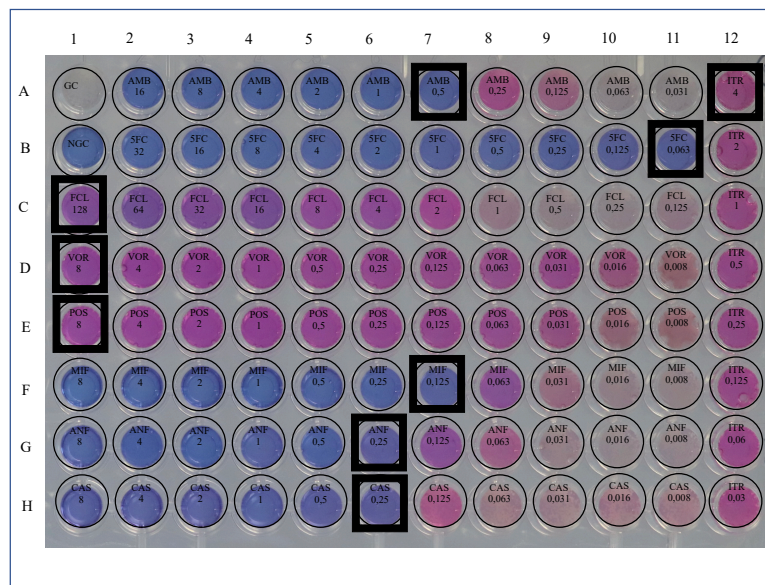


Abb. 5 Beispielauswertung des Micronaut AM mit CG56.

Die schwarze Umrandung zeigt die entsprechend gemessene MHK des klinischen Isolats. A7: 0,5 µg/ml Amphotericin B, B11: 0,063 µg/ml 5-Fluorocytosin, C1: 128 µg/ml Fluconazol, D1: 8 µg/ml Voriconazol, E1: 8 µg/ml Posaconazol, F7: 0,125 µg/ml Micafungin, G6: 0,25 µg/ml Anidulafungin, H6: 0,25 µg/ml Caspofungin, 12A: 4 µg/ml Itraconazol.

Abgebildet wird in horizontaler Richtung der Konzentrationsgradient der verschiedenen Antimykotika mit zusätzlicher Wachstumskontrolle (GC), sowie Negativkontrolle (NGC). A2-A11: AMB= Amphotericin B, B2-B11: 5FC= 5-Fluorocytosin, C1-C11: FCL= Fluconazol, D1-D11: VOR= Voriconazol, E1-E11: POS= Posaconazol, F1-F11: MIF= Micafungin, G1-G11: ANF= Anidulafungin, H1-H11: CAS= Caspofungin, Vertikal angeordnet ist 12A-12H: ITR= Itraconazol. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Konzentrationsangaben in µg/ml.

2.2.5 YEASTONE

Ähnlich zur Micronauttestung ist auch der Sensitire YeastOne ein kommerziell vorgefertigtes Kit zur Mikrodilutionsanalyse, welches jedoch nach den Richtlinien der CLSI hergestellt wurde. In der Mikrotiterplatte sind unterschiedliche Antimykotika und Farbkatalysatoren vorgelegt und es bedarf nur der Einstellung einer Hefesuspension mit McFarland von 0,5 in 2 ml A. dest mittels Densitometer, gefolgt von der Zugabe von 10 µl eingestellter Lösung in das Sensitire YeastOne RPMI Flüssigmedium. Nach Befüllung der Wells mittels Multikanalpipette innerhalb von 15 min und Versiegelung der Platte mit einer Folie, wurden die Platten lichtgeschützt bei 35 °C inkubiert

2 Material und Methoden

und nach 24 h ausgewertet und fotografiert. Ebenso wurde eine Einsaatkontrolle mit 10 μl der Negativkontrolle (Well A1) auf YPD-Agar ausplattiert und nach der Inkubationszeit ausgezählt. Die Bestimmung der MHK erfolgte durch den Farbumschlag des ersten Wells im Vergleich zur Wachstumskontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POS	AND 0,015	AND 0,03	AND 0,06	AND 0,12	AND 0,25	AND 0,5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AB 0,12
B	MF 0,008	MF 0,015	MF 0,03	MF 0,06	MF 0,12	MF 0,25	MF 0,5	MF 1	MF 2	MF 4	MF 8	AB 0,25
C	CAS 0,008	CAS 0,015	CAS 0,03	CAS 0,06	CAS 0,12	CAS 0,25	CAS 0,5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	AB 0,5
D	FC 0,06	FC 0,12	FC 0,25	FC 0,5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	AB 1
E	PZ 0,008	PZ 0,015	PZ 0,03	PZ 0,06	PZ 0,12	PZ 0,25	PZ 0,5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	AB 2
F	VOR 0,008	VOR 0,015	VOR 0,03	VOR 0,06	VOR 0,12	VOR 0,25	VOR 0,5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	AB 4
G	IZ 0,015	IZ 0,03	IZ 0,06	IZ 0,12	IZ 0,25	IZ 0,5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	AB 8
H	FZ 0,12	FZ 0,25	FZ 0,5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256

Abb. 6 Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte des YeastOne.

Abgebildet wird in horizontaler Richtung der Konzentrationsgradient der verschiedenen Antimykotika mit zusätzlicher Wachstumskontrolle (POS) A2-A11: AND= Anidulafungin, B2-B11: MF= Micafungin, C1-C11: CAS= Caspofungin, D1-D11: FC= 5-Fluorocytosin, E1-E11: PZ= Posaconazol, F1-F11: VOR= Voriconazol, G1-G11: IZ= Itraconazol, H1-H11: FL= Fluconazol, Vertikal angeordnet ist 12A-12H: AB= Amphotericin B.

Die angegebenen Zahlen entsprechen den Konzentrationsangaben in $\mu\text{g/ml}$.

2 Material und Methoden



Abb. 7 Beispielauswertung des Micronaut AM mit CG22.

Die schwarze Umrandung zeigt die entsprechend gemessene MHK des klinischen Isolats. A6: 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Anidulafungin, B3: 0,03 $\mu\text{g/ml}$ Micafungin, C6: 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin, D1: 0,06 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fluorocytosin, E9: 2 $\mu\text{g/ml}$ Posaconazol, F7: 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Voriconazol, G7: 1 $\mu\text{g/ml}$ Itraconazol, H8: 16 $\mu\text{g/ml}$ Fluconazol, 12E: 2 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B.

Abgebildet wird in horizontaler Richtung der Konzentrationsgradient der verschiedenen Antimykotika mit zusätzlicher Wachstumskontrolle (POS) A2-A11: AND= Anidulafungin, B2-B11: MF= Micafungin, C1-C11: CAS= Caspofungin, D1-D11: FC= 5-Fluorocytosin, E1-E11: PZ= Posaconazol, F1-F11: VOR= Voriconazol, G1-G11: IZ= Itraconazol, H1-H11: FL= Fluconazol, Vertikal angeordnet ist 12A-12H: AB= Amphotericin B.

Die angegebenen Zahlen entsprechen den Konzentrationsangaben in $\mu\text{g/ml}$.

2.2.6 Epsilometertest (Etest)

Für weitere Bestimmungen der MHK und die Verifizierung, dass die 10 Einzelkolonien einheitliche MHKs aufweisen, wurden auch Etests (Biomerieux) durchgeführt. Hierfür wurde eine Übernachtskultur in 5 ml YPD-Flüssigmedium angesetzt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach 8-12 Stunden wurde mittels Neubauer Zählkammer - Improved die Zellzahl auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 500 μ l der verdünnten Zellsuspension auf RPMI-Agar ausplattiert. Die auf Raumtemperatur vorgewärmten Teststreifen wurden mittig und blasenfrei auf die Platte gelegt und durch leichten Anpressdruck fixiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Anidulafungin und Amphotericin B Etests durchgeführt und der Einfluss von Myriocin getestet. Dieses wurde in Methanol gelöst und vor der Zellsuspension auf das RPMI Agar ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C wurden die MHKs visuell abgelesen.



Abb. 8 Beispiel Foto eines Anidulafungin-Etests (Biomerieux) des *C. glabrata*-Stamm CG56. Der rote Pfeil beschreibt den abzulesenden MHK-Wert von 0,38 μ g/ml.

2.2.7 RNA-Isolation

Um die RNA zu isolieren, wurden von den *C. glabrata*- Stämmen Flüssigkulturen in 5 ml YPD angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Darauf erfolgte das Erstellen einer Induktionskultur in einer 1:100 Verdünnung in 20 ml YPD. Für manche Ansätze wurde die Induktionskultur mit Antimykotikum (Anidulafungin, Amphotericin B) angesetzt und eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für den CBS138, den *C. glabrata* Referenzstamm, wurde in Kombination mit Antimykotikum eine Verdünnung in 50 ml YPD verwendet, um am Ende ausreichend Zellen für die Extraktion zur Verfügung zu haben. Die Inkubationszeiten waren variabel, je nach Zusatz 1 h, 2 h und 4 h. Die RNA Isolierung erfolgte in biologischen Triplikaten. Zunächst wurden die Kulturen fünf min bei 4000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 μ l AE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 40 μ l 10%igen SDS und drei mal zehn Sekunden vortexen wurde unter dem Abzug die gleiche Menge (440 μ l) Acidic-Phenol-Chloroform (pH 4,5) beigefügt. Nach erneutem dreimaligen Mischen für zehn Sekunden mittels Vortexgerät folgte eine Inkubation von fünf min bei 65 °C. Daraufhin wurden die Zellen mindestens 30 min bei -20 °C gefroren und fünf min bei 65 °C erneut aufgewärmt. Bevor die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, wurden die Proben vier min bei 16000 xg zentrifugiert. Darauf folgte die Zugabe von 60 μ l 3 M Natriumacetat und 600 μ l Isopropanol und ein Mischen durch Schwenken. Nach einer erneuten Inkubation von 30 min bei -20 °C, gefolgt von 10 min zentrifugieren bei 12000 xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweifach mit 100 μ l 70% Ethanol gewaschen und fünf min bei 12000 xg zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 100-500 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die mittelfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C, langfristig wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.8 Bioanalyser-Analyse der RNA

Um die Qualität und die Quantität der RNA zu analysieren, wurde der Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent) und die gleichnamige Software verwendet. Das Agilent RNA 6000 Nano Kit wurde wie vom Hersteller beschrieben, verwendet. Zunächst wird der Farbstoff 30 min auf Raumtemperatur erwärmt, 1 μ l davon auf 65 μ l Gel gegeben und zehn min bei 12000 xg zentrifugiert. 1,5 μ l der Proben, sowie die Leiter werden mittels Thermocycler zwei min auf 70 °C erhitzt und dann in den RNA Nano Chip pipettiert. Zuvor wurde das Gel gleichmäßig im Chip verteilt, und nach Zugabe von Proben und Ladepuffer eine Minute gemischt. Anschließend begann die Analyse im Bioanalyser. Wichtig für die weiteren Versuche waren die Qualität der RNA, die durch die RNA-Integritäts-Nummer (RIN) beschrieben werden kann und die RNA Konzentration, um die für die RT-qPCR benötigte Konzentration von 100 μ g/ μ l einzustellen.

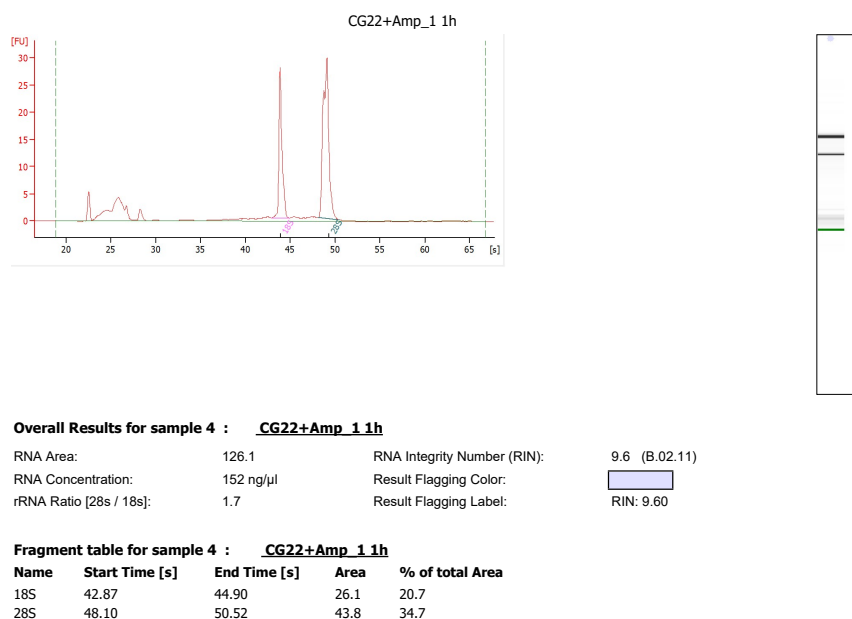


Abb. 9 Beispielhafte Darstellung eines Bioanalyser Assays des *C. glabrata*- Stamm CG22

2.2.9 Reverse Transkription gefolgt von quantitativer PCR (RT-qPCR)

Für die Analyse der Expression verschiedener Gene, wurde das Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs) verwendet. Das One-Step Verfahren beinhaltet die Umwandlung der RNA in cDNA und die Amplifizierung durch eine DNA-Polymerase in einem Schritt. Der verwendete Farbstoff SYBR Green ist fluoreszierend, an die DNA bindend und lichtempfindlich, weswegen der Versuchsaufbau weitestgehend abgedunkelt stattfand. Die Zusammensetzung des Ansatzes für die RT-qPCR ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die zuvor isolierte und analysierte RNA wurde auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt, wovon 1 μl in eine Mikrotitrationsplatte vorgelegt und anschließend 19 μl Mastermix hinzugefügt wurden. Nach Versiegelung mit einer Schutzfolie, gründlichem Vortexen und Abzentrifugieren der Platte wurde die Reaktion im qTower gestartet. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert und Errechnung der relativen Expression. Als Referenzgen für die Berechnungen wurde *PDC1* verwendet und als Referenz diente Total-RNA des Stammes *C. glabrata* CBS138. Das PCR Programm sowie die verwendeten Oligonukleotidprimer sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

Tabelle 6 Ansatz für RT-qPCR

Ansatz pro Reaktion	20 μl
RNA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1 μl
Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	10 μl
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	1 μl
Primer 1	1 μl
Primer 2	1 μl
RNAse-freies Wasser	6 μl

Tabelle 7 RTq-PCR Programm

	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (m:s)	
Reverse Transkription	55	10:00	
Initiale Denaturierung	95	1:00	
Denaturierung	95	0:10	} 40x
Extension	60	0:30	
Schmelzkurve 60 bis 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s mit $\Delta T=1^{\circ}\text{C}$			

Tabelle 8 Oligonukleotid Primer für RT-qPCR mit Sequenz in 5'-3'-Orientierung und notwendiger Schmelztemperatur in °C

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur
R1-CgPDC1	AGAGTTATCTTGTTTCATTGGTGAC	52.3
R2-CgPDC1	CTTAGCACCGAAGGTTGGCA	53.8
R1-CgERG2	ATGTCATCCTATTTGGTACCGCAG	55.7
R2-CgERG2	GTTTTGATCCATAGCGTATTGCTTTG	54.8
R1-CgERG3	CACTCCATTCGCCTCCCAC	55.4
R2-CgERG3	GTACAAGTGGTGGACGGTGTG	56.3
R1-CgERG6	ATGAAGAGCACCGTAAGATCGCTTA	56.0
R2-CgERG6	CATACAGTTAGTGAATTTTCTACCGAAG	55.5
R1-CgERG11	AGTCTCCCCAGGTTACTACTCAC	56.7
R2-CgERG11	ACACCCAATTGACAGTAAGCGAAC	55.7
R1-CgFKS1	ATGACCATGCAAACACTGCCTTC	55.3
R2-CgFKS1	GTGGACGGATTTGACGCGATG	56.3
R1-CgFKS2	GACAGGTAAGTGGTATGGTTCTG	55.3
R2-CgFKS2	ATTGGTGGGCGAATATGACGAGA	55.3
R1-CgRDN5.8	TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGA	55.3
R2-CgRDN5.8	GGAATACCAGAGGGCGCAATG	54.4
R1-CgSOD2	AGCTGCACGTGATCTAATCCAAG	55.3
R2-CgSOD2	CCAATTTGGCATTGGTGACCTC	54.8
R1-CgCTA1	GAAGGGTGAATGGCACTATGTC	54.8
R2-CgCTA1	AGTCGAAGACAGAGAATGGCAAC	55.3
R1-CgGRX2	AGCAAACCCTGTTCTGAAGAATTGA	54.0
R2-CgGRX2	CACCAATGTGTTGACCATCGATG	55.3
R1-CgYAP1	CTTTGGCATTCCCAGGTGACTA	54.8
R2-CgYAP1	GATGGCTCCTCTTTAACCAATCC	55.3
R1-CgMSN2	CAGCGACTGGCAAGGACAAGAA	56.7
R2-CgMSN2	TCGTTCGTCATCGTTGTTGTTATTG	54.0
R1-CgMSN4	CACTGACTTCGCCAACTAGAACTC	57.4
R2-CgMSN4	GGTCTTCGCCTTCGTTCAAGTC	56.7

2.2.10 Sterolanalyse

Die Sterolzusammensetzung der Zellmembran in *Candida*-Zellen hat einen Einfluss auf die Belastbarkeit der Zelle und auf das Resistenzverhalten der Pilze. Die Sterolanalyse wurde freundlicherweise durch Dr. Christoph Müller vom Pharmazeutischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Der Sterolstoffwechselweg von Squalen zu Ergosterol beinhaltet zehn Enzyme, die zu unterschiedlichen Zwischenprodukten führen und durch *ERG*-Gene codiert werden. Diese Zwischenprodukte wurden durch Dr. Christoph Müller mittels Gas-Chromatographie-EI-Massen-Spektrometrie (GC-EI-MS) analysiert. [50] Zur Vorbereitung wurden von jedem benötigten Stamm in Dreifachbestimmung Zellen geerntet, die dann versendet worden sind. Die *Candida*-Stämme wurden wie üblich über Nacht kultiviert und am darauf folgenden Tag wurde erneut eine Induktionskultur erstellt, die mit Hilfe eines Spektrophotometers auf eine OD_{600} von 0,1 in 400 ml YPD verdünnt wurde. Die Kulturen wurden weitere vier bis fünf Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert und nach Erreichen einer OD_{600} von 1 wurden die Zellen geerntet. Pro Kolben wurde die Zellsuspension auf acht 50 ml Falkons verteilt, abzentrifugiert und in 3 ml A. dest. resuspendiert, erneut zentrifugiert und nochmals in 1 ml A. dest. gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und gesammelt auf Trockeneis nach München versandt.

2.2.11 Stresstestungen

Um ein besseres Verständnis zur Strapazierfähigkeit verschiedener *Candida* Stämme zu bekommen, wurden unterschiedliche Plattentropftests durchgeführt. Hierfür wurden SDG und YPD-Festmedien verwendet und mit diversen Zusätzen (Tabelle 10) versehen. Das feste Nährmedium wurde in der Mikrowelle geschmolzen und die Stressmediatoren beigefügt. Nach Abkühlen der Platte konnten 5 μ l verdünnter Hefekultur aufgetropft werden. Die verwendeten *Candida*-Stämme wurden zunächst in einer Flüssigkultur über Nacht angezüchtet und am Versuchstag wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Auf alle Platten wurden vier (unverdünnt, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) Verdünnungen pro Stamm aufgetragen.

Tabelle 9 Verwendete Stressmediatoren und die auslösende Stressart

Stressmediator	Stressart
Congored	Zellwandstress
Menadion	Oxidativer Stress
DTT	ER Stress
NaCl	Osmotischer Stress
Calcofluor	Zellwandstress
15 min bei 50 °C	Hitzeschock
drei Tage bei 42 °C	Thermo-Stress

3 Ergebnisse

3.1 Resistenzverhalten der klinischen *C. glabrata* Isolate CG56 und CG22

In vorhergehenden Untersuchungen wurden durch Aldejohann et al. [45] klinische Isolate auf ihr Resistenzmuster gegen Echinocandine untersucht und anschließend auf Resistenzen in den HS der Gene *FKS1* und *FKS2* analysiert. Die bei den Untersuchungen besonders auffälligen Stämme CG56 und CG22 stehen im Fokus der vorliegenden Arbeit. Hier wurde keine Mutationen in den *FKS1* und *FKS2* Hs-Regionen nachgewiesen und dennoch zeigte sich in beiden Stämmen eine Resistenz gegen Echinocandine und wurden demnach als Borderline Isolate definiert. Neben der Echinocandin-Resistenz war das klinische Isolat CG22 auch resistent gegen Amphotericin B und konnte nicht nur als multiresistent (MDR) sondern bereits als panresistent bezeichnet werden, da das Isolat gegen Anidulafungin, Amphotericin B und manchen Azolen Resistenzen aufzeigte. Der klinische Stamm CG56 hingegen wurde mit einer Resistenz gegen Echinocandine und auch Fluconazol als multiresistenter *C. glabrata* Isolat definiert. Zunächst wurde das Resistenzverhalten der zwei *C. glabrata*-Stämme, die in dieser Arbeit im Fokus stehen, überprüft. Hierfür wurden verschiedene Prüfverfahren herangezogen und in Abbildung 10 zusammengefasst. Nach den standardisierten Testungen MicronautAM und YeastOne ergab sich für beide Isolate eine Resistenz gegen Anidulafungin und CG22 zeigt eine Resistenz gegen Amphotericin B. Der Referenzstamm CBS138 wurde zur Kontrolle mitgeführt und zeigt ein sensitives Verhalten. Die Breakpoints gemäß EUCAST und CLSI sind ebenso aus der Tabelle ersichtlich und zeigen die Grenzwerte für *C. glabrata*.

3 Ergebnisse

	Amphotericin B	5-Flucytosin	Fluconazol	Voriconazol	Posaconazol	Micafungin	Anidulafungin	Caspofungin	Itraconazol
Breakpoints gemäß EUCAST (in µg/mL)	(S) Sensibel (≤): 1 (I) Sensibel, erhöhte Exposition: - (R) Resistent (≥): 2	S: 4 I: 8-16 R: 32	S: 0,001 I: 0,002-16 R: 32	S: - I: - R: -	S: - I: - R: -	S: 0,03 I: - R: 0,06	S: 0,06 I: - R: 0,125	<i>Klin. Beurteilung kann von AND abgeleitet werden</i>	S: - I: - R: -
Micronaut									
CBS138	0,25	<0,06	16	0,125	0,5	0,015	0,03	0,125	0,25
CG22	2	0,06	8	0,25	1	0,016	0,25	0,25	4
CG56	0,5	<0,06	>128	>8	>8	0,125	0,25	0,25	>4
Breakpoints gemäß CLSI (in µg/mL)	S: - I: - R: -	S: - I: - R: -	S: - I: 32 R: 64	S: - I: - R: -	S: - I: - R: -	S: 0,06 I: 0,12 R: 0,25	S: 0,12 I: 0,25 R: 0,5	S: 0,12 I: 0,25 R: 0,5	S: - I: - R: -
Yeast One									
CBS138	0,25	<0,06	64	0,5	1	0,015	0,03	0,06	0,5
CG22	2	<0,06	8	0,5	2	0,03	0,25	0,25	1
CG56	1	<0,06	>256	8	8	0,5	0,25	0,5	>16

Abb. 10 Zusammenfassung der MHK-Werte der Micronaut und YeastOne Testungen der klinischen *C. glabrata*-Isolate CG22, CG56 und CBS138 mit entsprechenden Breakpoints gemäß EUCAST und CLSI. [52]

Farblich hervorgehoben wurden die Ergebnisse für Amphotericin B und Anidulafungin. Die farbliche Unterlegung bedeutet: grün= sensitiv, gelb = sensibel, erhöhte Exposition, rot = resistent.

Neben der Microdilution wurden auch Etests mit Anidulafungin und Amphotericin B mit den Stämmen CBS138, CG22 und CG56 durchgeführt. Auch hier zeigt sich in der MHK, dass CG22 resistent gegen Anidulafungin und Amphotericin B ist. CG56 zeigte unter Einfluss von Amphotericin B ein sensitives Verhalten. Bei Anidulafungin lag die MHK bei 0,25 und war somit resistent. Die Sensitivität des CBS138 konnte ebenfalls in Etests bestätigt werden.

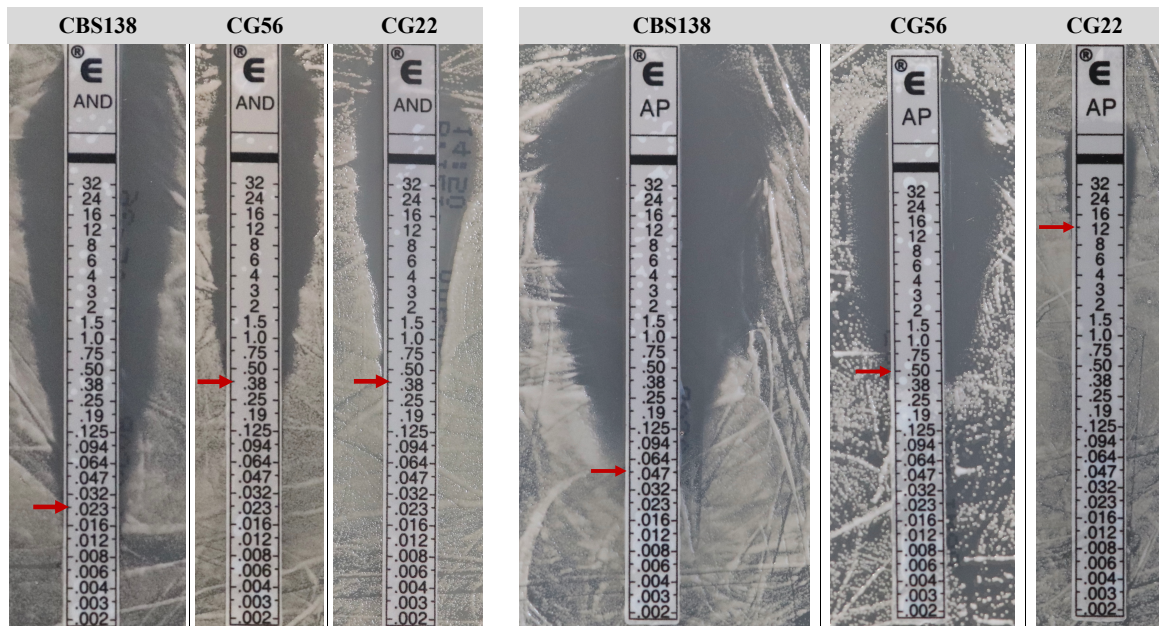


Abb. 11 Abbildung der Epsilometermessungen mit Amphotericin B und Anidulafungin nach 24 h. In den drei Bildern links dargestellt sind die Ergebnisse für Anidulafungin (AND) und in den drei Bildern rechts für Amphotericin B (AP). Die roten Pfeile markieren die jeweiligen gemessenen MHKs. Für Anidulafungin ergibt sich eine MHK des CBS138 von 0,023 $\mu\text{g}/\text{m}$, CG56 und CG22 beide bei 0,38 $\mu\text{g}/\text{m}$. Amphotericin B erzeugt eine MHK für CBS von 0,047 $\mu\text{g}/\text{m}$, für CG56: 0,50 $\mu\text{g}/\text{m}$ und für CG22 liegt eine MHK von 12 $\mu\text{g}/\text{m}$ vor.

3.2 Verhalten des klinischen *C. glabrata* Isolats CG56

Da der Stamm CG56 mit seinem Resistenzverhalten gegen Echinocandine und keiner nachweislichen Mutation in den *FKS1* und *FKS2* Hotspot-Regionen im Zentrum dieser Arbeit stand, mussten im Vorfeld einige naheliegende Erklärungsversuche untersucht werden. Zunächst wurde sichergestellt, dass es sich um eine Reinkultur von *C. glabrata* Zellen handelte und keine Mischkultur unterschiedlicher Pilze vorlag. Des Weiteren sollte eine Verhaltensprüfung mehrerer einzelner Kolonien des Isolates ein heterogenes Resistenzmuster ausschließen und bestätigen, dass es sich um einheitliche Ergebnisse handelte. Zusätzlich musste das Fehlen von Mutationen in allen Einzelkolonien verifiziert werden, um die Hotspot-Mutation als Ursprung der Resistenz auszuschließen.

3.2.1 Wachstum auf Chromagar

Zum Ausschluss einer Mischkultur von mehreren *Candida* Spezies wurde CG56 auf Chrom-Agar ausplattiert. Chromagar ist ein selektives Differenzierungsmedium bei dem sich die verschiedenen *Candida* Spezies in unterschiedlichen Farben darstellen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C konnte direkt visuell nachgewiesen werden, dass es sich um eine einheitlich rosa-mauve farbene Kultur handelte, die darauf schließen ließ, dass eine reine *C. glabrata* Kultur vorlag.



Abb. 12 Wachstumsdarstellung von CG56 auf Chromagar. CG56 24 h lang auf Chromagar kultiviert in rosa-moaver Farbe als Beleg für eine Reinkultur *C. glabrata*.

3.2.2 Verhalten von 10 Einzelkolonien in Resistenztests: Micronaut AM, Etest

Zur Feststellung von Unterschieden im Resistenzverhalten innerhalb des Isolates CG56 oder in der Gensequenz wurden zehn Einzelkolonien des CG56 angezchtet und die Versuche mit den Einzelkolonien und zusätzlich mit CG56 durchgeführt. Dies sollte aufklären, ob eine Minderheit im Isolat für die Resistenz ursächlich sein könnte. Da ein homogenes Verhalten der Einzelkolonien bestätigt werden konnte, sind im weiteren Verlauf der Arbeit die Wiederholung auf biologische Triplikate reduziert worden.

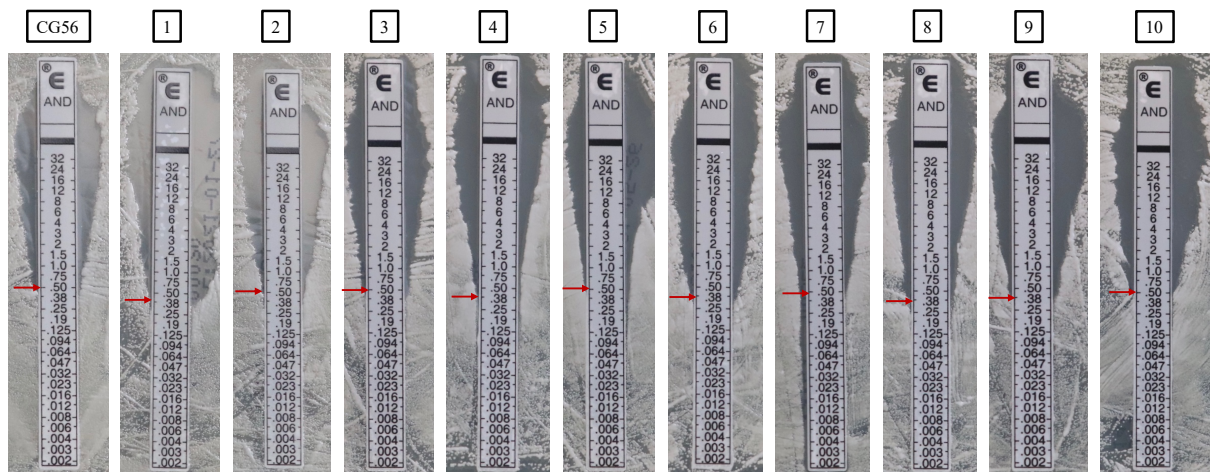


Abb. 13 Zusammenfassung der Etests von zehn Einzelkolonien des CG56. Etest durchgeführt mit Anidulafungin an 10 Einzelkolonien des klinischen Isolates CG56 nach 48 h. Die MHK Werte aller Einzelkolonien und von CG56 wiesen eine MHK zwischen 0,38 mg/L und 0,5 mg/L auf (rote Pfeile).

Abb. 14 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der beiden Antimykotika Anidulafungin und Amphotericin B. Die Micronauttestung fand mit zehn Einzelkolonien und dem CG56 statt und wurde zweifach durchgeführt. Für alle 10 Einzelkolonien konnte eine MHK für Anidulafungin von 0,25 mg/L plusminus einer Verdünnungsstufe festgestellt werden. Damit lagen alle Werte im Rahmen der Messungenauigkeit des Micronaut-Test. Hier wurde eine Abweichung von je einem Well toleriert und somit entstand eine 100% Übereinstimmung der zehn Einzelkolonien mit dem CG56. Auch bei Amphotericin B wurde acht mal eine MHK von 0,5 angezeigt und zwei weitere Kolonien befanden sich mit dem MHK Wert von 1 mg/L nur ein Well von der Mehrheit entfernt. Eine Messung wies eine MHK von 0,125 mg/L auf, dies konnte auch als Messungenauigkeit interpretiert werden.

3 Ergebnisse

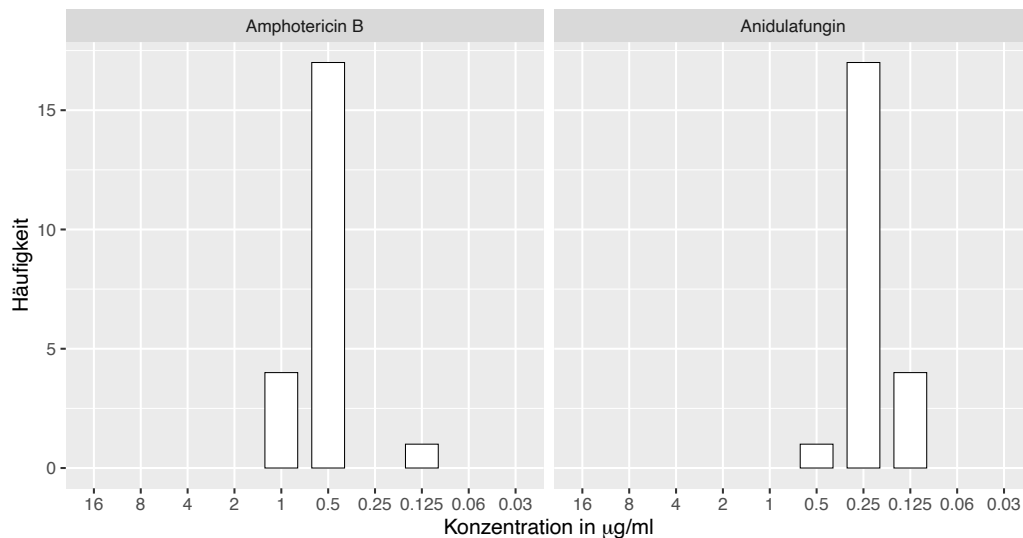


Abb. 14 Zusammenfassung der Micronautergebnissen von 10 Einzelkolonien des klinischen Isolats CG56 in Doppeltestung für AMB und AND: links die Häufigkeit der gleichen MHK von Amphotericin B (AMB) und rechts von Anidulafungin (AND). 17 Messungen wiesen bei AMB eine MHK von 0,5 mg/L auf, bei Anidulafungin lag die MHK ebenfalls von 17 Messungen bei 0,25 mg/L. Die anderen Messwerte befanden sich im Bereich der Messgenauigkeit.

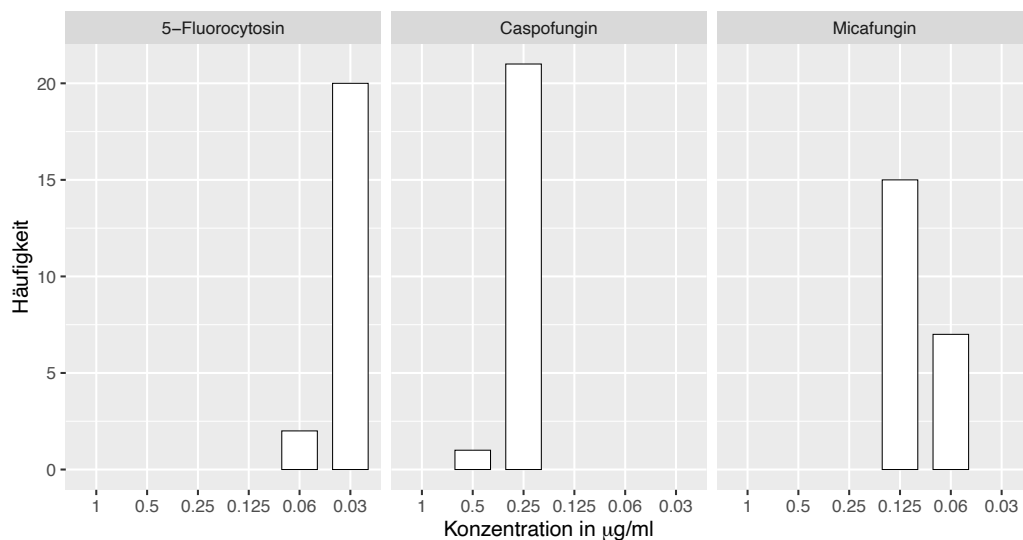


Abb. 15 Zusammenfassung der Micronautergebnissen von 10 Einzelkolonien des klinischen Isolats CG56 in Doppeltestung für Caspofungin, Micafungin und 5-Fluorocytosin: links die Häufigkeit der gleichen MHK von 5-Fluorocytosin, in der Mitte von Caspofungin und rechts von Micafungin. 20 Messungen wiesen bei 5FC eine MHK von 0,03 mg/L auf, bei Caspofungin lag die MHK von 21 Messungen bei 0,25 mg/L und bei Micafungin lag die MHK bei 15 Messungen bei 0,125 mg/L. Die anderen Messwerte befanden sich im Bereich der Messgenauigkeit.

3 Ergebnisse

Auch in den Antimykotika 5-Fluorocytosin, Caspofungin und Micafungin zeigten die Einzelkolonien ein einheitliches Verhalten. Abb. 15 zeigt die direkte Häufigkeit des selben Ergebnisses innerhalb der Micronauttestung des CG56 für die oben genannten Antimykotika.

Bei der Auswertung der Micronauttestung der Einzelkolonien des CG56 für die Azole ergab sich kein so einheitliches Bild. Bei Fluconazol zeigte sich durchgängig eine MHK größer 4 mg/L. Die Ergebnisse der Azole Itraconazol, Posaconazol und Voriconazol wiesen auf eine breite Verteilung der MHKs hin. Die Auswertung der drei genannten Antimykotika gestaltet sich zusätzlich schwierig, da es für *C. glabrata* gemäß EUCAST noch keine definierten Breakpoints gibt. Lediglich für Fluconazol gilt ein *C. glabrata*-Stamm resistent, wenn die MKH bei 32 mg/L liegt. Im Bereich 0,002-16 mg/L gilt der Stamm als sensibel mit erhöhter Exposition. So ergaben acht Messungen eine Resistenz gegen Fluconazol, während 14 Messungen als sensibel mit erhöhter Exposition zu definieren waren. Zu den übrigen Antimykotika kann keine klare Aussage getroffen werden.

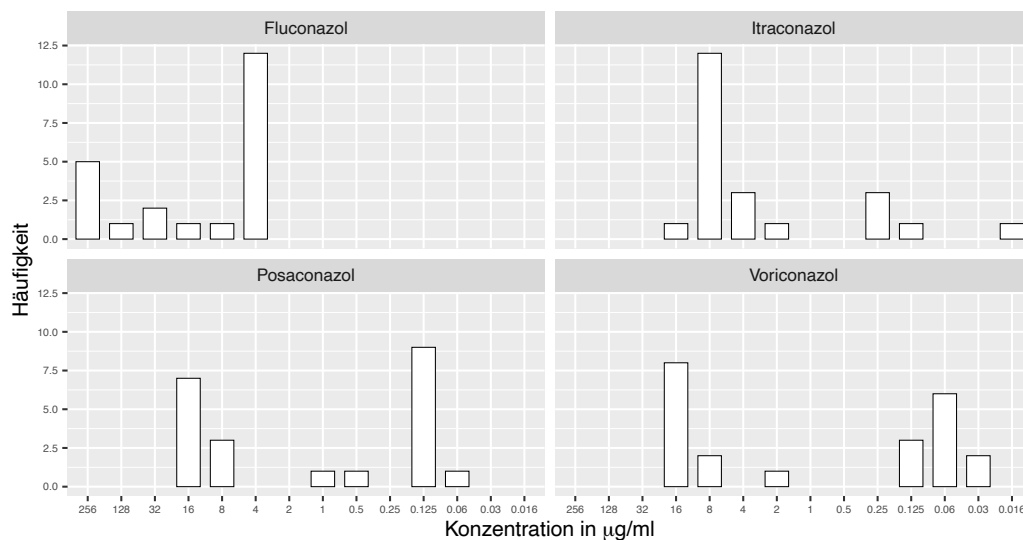


Abb. 16 Zusammenfassung der Micronautergebnissen von 10 Einzelkolonien des klinischen Isolats CG56 in Doppeltestung: oben links die Häufigkeit der gleichen MHK von Fluconazol, oben rechts von Itraconazol, unten links von Posaconazol und unten rechts Voriconazol. Gemäß EUCAST nur Breakpoints von Fluconazol definiert, ab MHK von 32 mg/L resistent, 0,002-16 mg/L erhöhte Exposition. 8 Messungen zeigen somit ein resistentes Verhalten und 14 Messungen ein sensibles Verhalten mit erhöhter Exposition. Die übrigen Antimykotika zeigen keine klare Aussage.

3.2.3 Analyse der FKS Sequenzen

Mutationen in den Hotspot-Regionen der *C. glabrata* Gene *FKS1* und *FKS2* korrelieren in der Regel mit einer Resistenz gegen Echinocandine. [56] Um zu bestätigen, dass alle Einzelkolonien die selbe *FKS1* und *FKS2* Hotspot-Sequenz aufwiesen, wurde die Polymerasekettenreaktion mit zehn Einzelkolonien durchgeführt. Das dargestellte Gelelektrophorese Bild (Abb. [17]) zeigt beispielhaft die einheitlichen Banden für die *FKS2* Hotspot-PCR. Dies deutet darauf hin, dass in allen Proben das gleiche PCR Produkt vorlag. Dies galt für *FKS1* und *FKS2* in Hotspot 1 (HS1) und Hotspot 2 (HS2).

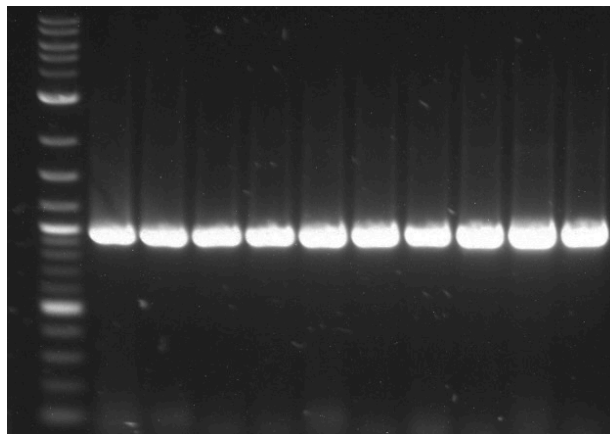


Abb. 17 Beispielbild der *FKS2* Hotspot-PCR mit zehn Einzelkolonien des CG56. Die zehn Kolonien zeigen einheitliche PCR Banden bei ca. 1000bp

Die PCR Produkte aller Einzelkolonien sowie von CG56 wurden nach Berlin zu LGC Genomics zur Sequenzierung geschickt, um die Aminosäuresequenzen miteinander vergleichen zu können. Nach Erhalt der Sequenzierung wurden die Sequenzen mittels Alignmentprogramm PRALINE auf Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz untersucht. Abb. [18] zeigt beispielhaft das Alignment der zehn Einzelkolonien und CG56 für den Hotspot 1 des Gens *FKS1*. Die Aminosäuresequenzen stimmen in allen 11 Proben überein und lassen darauf schließen, dass innerhalb der HS-Regionen keine Mutationen vorliegen. Bei keinem der beiden Gene *FKS1* und *FKS2* waren in den HS-Regionen eins und zwei Mutationen auffindbar. Da ein Zusammenhang von FKS-HS Mutationen und Echinocandin-Resistenz besteht, [57] konnte das Resistenzverhalten des CG56 somit noch nicht geklärt werden.

3 Ergebnisse

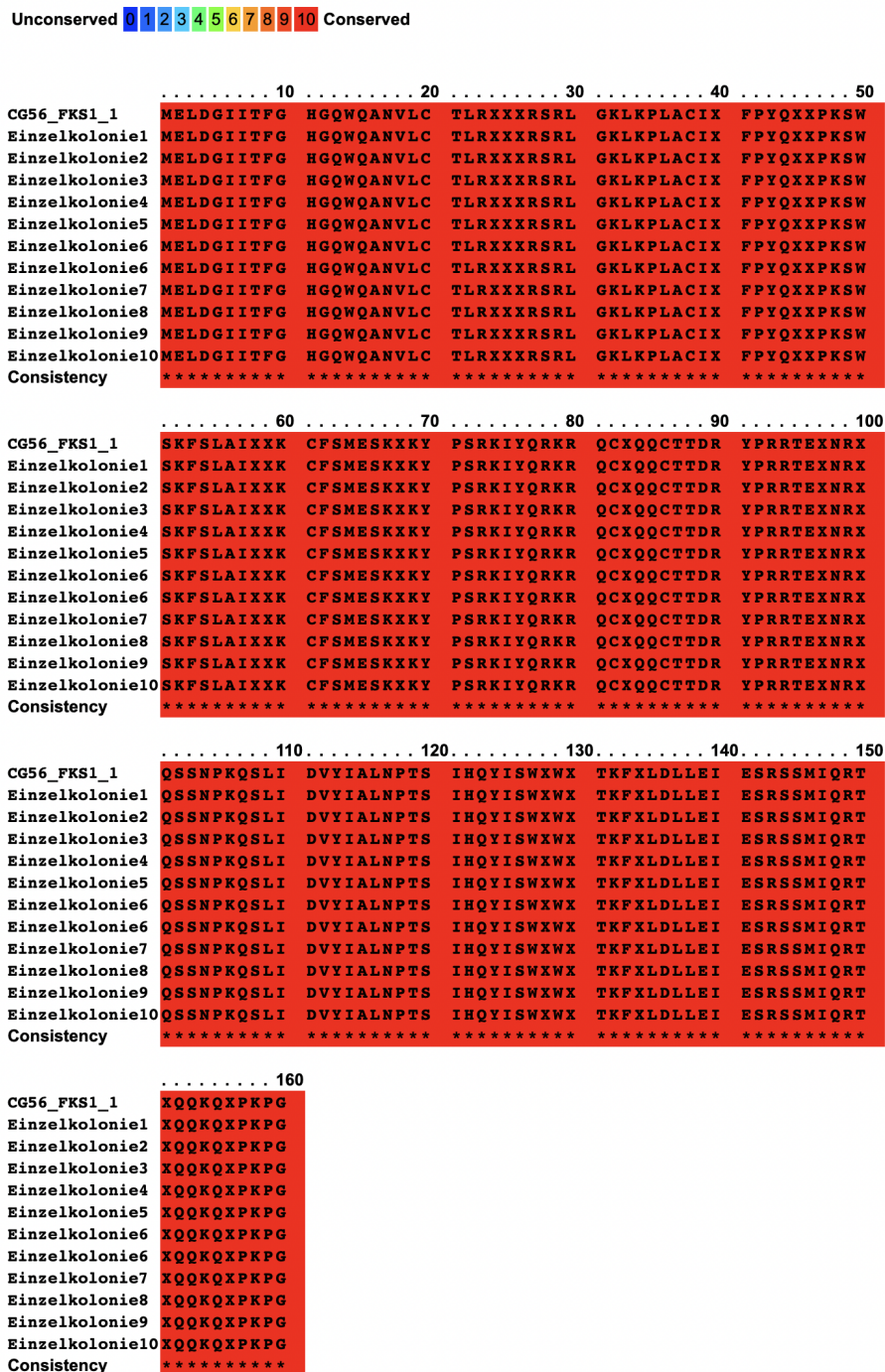


Abb. 18 Beispielbild für ein Alignment von CG56 und zehn Einzelkolonien. Das Alignment wurde durch das Programm PRALINE erstellt und zeigt die übereinstimmende Aminosäuresequenz von CG56 und den zehn Einzelkolonien im Hotspot 1 des Gens *FKS1*.

3.3 Genomsequenzierung von CG56 und CG22

Für genauere Analysen wurde eine gesamte Genomsequenzierung von mehreren multiresistenten *C. glabrata* Isolaten am Broad Institute (USA) durchgeführt. Abb. 13 zeigt die Mutationen in CG22 und CG56, die im gesamten Genom vorlagen. Die Analyse wurde freundlicherweise von Aina Martinez Zurita erstellt. Neben einer Mutation in *FKS1* und *FKS2* zeigte CG56 auch eine Mutation in *ERG3*. In der *FKS2* Mutation des CG56 Thr970Ile wurde aus dem Codon ACC ATC und somit aus Threonin Isoleucin. Diese Mutation befand sich 48bp vor dem zweiten Hotspot *FKS2* und zeigte, dass auch eine Mutation außerhalb der Hotspot Regionen Einfluss auf den Resistenzmechanismus gegen Echinocandinen haben könnte. Zusätzlich besaß CG56 eine Loss-of-Function-Mutation in *ERG3*. Die *ERG*-Gene codieren Enzyme des Ergosterol Biosynthese Pathways, welcher eine zentrale Rolle im Resistenzmechanismus von Amphotericin B spielt. CG56 war im Vergleich zu CG22 jedoch nicht resistent gegen Amphotericin B. Bei der Genomanalyse von CG22 konnte ebenfalls eine loss of function mutation von *ERG3* aber auch von *ERG4* bestätigt werden.

HKR1_OSc	■	
EAF1_OSc.p.Asn466fs	▲	
EAF1_OSc.p.Asn458fs	▲	
ERG4.p.Thr158fs	■	
ERG3.p.Gln26*	■	
ERG3.p.Met1?		■
EPA3.p.Asn354fs	■	
HAL9.p.Val300Ile	■	
FKS1.p.Lys1323Asn		■
FKS2.p.Thr970fs		■
FKS2.p.Thr970Ile		■
Polyene (AmB)	●	○
Azole (Fluconazol)	●	○
Echinocandine (Anidulafungin)	●	●
	CG22	CG56

Abb. 19 Darstellung der vorhandenen Mutationen in CG22 und CG56 durch die Analyse des Broad Institutes. Zusammenfassung der klinischen Isolate CG22 und CG56 im Resistenzverhalten gegenüber Polyenen, Azolen und Echinocandinen und der aufgefundenen Mutationen. Ausgefüllte Zeichen bedeuten Zutreffen auf den Stamm, nicht ausgefüllte oder fehlende Zeichen sollen Nichtvorhandensein darstellen.

3.4 Verifizierung der Mutationen in CG22

Um die Ergebnisse des Broad- Institutes zu verifizieren und zu prüfen, wurden weitere PCRs durchgeführt und zur Sequenzierung eingesandt. Die Sequenzen wurden mittels Alignmentprogramm PRALINE mit dem Referenzstamm CBS138 verglichen und die Ergebnisse zeigen, dass CG22 in *ERG3* zwei Mutationen am Anfang des Gens aufweist. Ausschlaggebend hierbei ist die Mutation Q26stop im CG22, da die Mutation hier zu einem Stopcodon führt und demnach *ERG3* nicht produziert werden kann. Die Mutation von CG22 in *ERG4* zeigt, dass nach etwa 160 Aminosäuren die Mutation zu einer vollständigen Veränderung des restlichen Gens führte. Dies hatte zur Folge, dass *ERG4* seine komplette Funktion verlor. *ERG4* ist ein Transmembranprotein, das aus sechs Untereinheiten besteht und eine Mutation nach 160 Aminosäuren führt nahe der dritten Transmembrandomäne zu einem Funktionsverlust und nicht ausreichend Halt in der Zellmembran.

 10 20 30 40 50	
CBS138_ERG3	MDLVLETLDH	YIFDDVYAKI	APVELQ	RGID	DSLVNALSLN	KIVSNSTLLH
CG22_ERG3	MDLVLETLDH	YIFDDVYAKI	APVELX	RGID	NSLVNALSIN	KIVSNSTLLH
Consistency	*****	*****	*****6	*****	5*****	*****
 60 70 80 90 100	
CBS138_ERG3	ETLSITNSLK	RVNKDVYGLT	PFLDFPTEKT	YASLLPRNNL	IREFFSLWAV	
CG22_ERG3	ETLSITNSLK	RVNKDVYGLT	PFLDFPTEKT	YASLLPRNNL	IREFFSLWAV	
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****	
 110 120 130 140 150	
CBS138_ERG3	VTVFGLLLYL	ITASLSYVPV	FDRTIPNHPK	YLKNQMYLEI	KLAVSAIPTM	
CG22_ERG3	VTVFGLLLYL	ITASLSYVPV	FDRTIPNHPK	YLKNQMYLEI	KLAVSAIPTM	
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****	
 160 170 180 190 200	
CBS138_ERG3	SLLTVPWFML	ELNGYSKLYY	DVDWEHHGLR	KLLIEYATFI	PFTDCGIYLA	
CG22_ERG3	SLLTVPWFML	ELNGYSKLYY	DVDWEHHGLR	KLLIEYATFI	PFTDCGIYLA	
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****	

Abb. 20 Alignment *ERG3* von CBS138 mit CG22 CG22 zeigt Mutationen an Position 26 (gelb) und 31 (grün). Aussschlaggebend für den Funktionsverlust ist das Stopcodon (X) an Position 26.

3 Ergebnisse

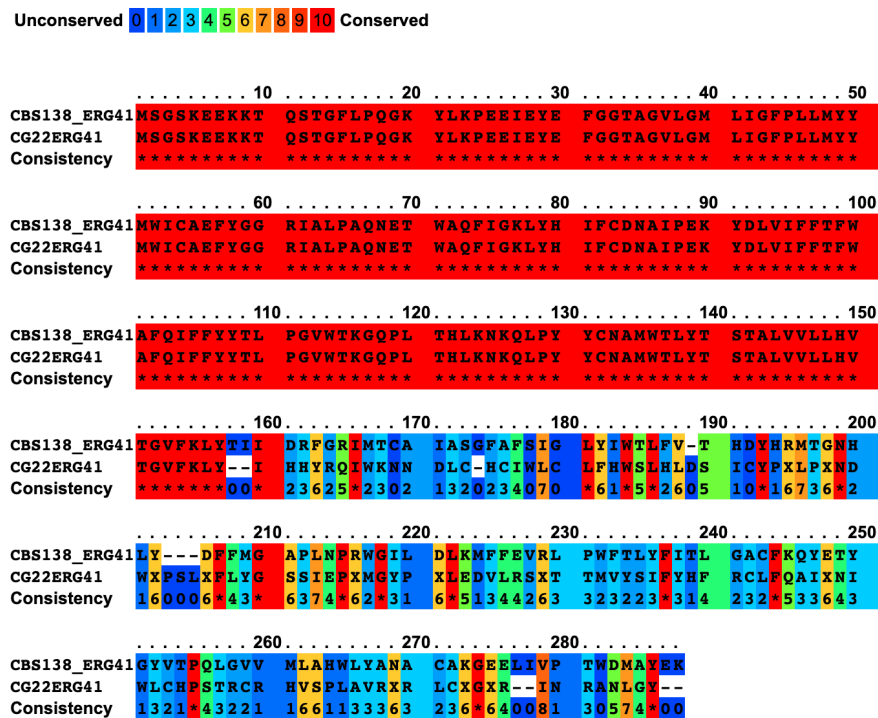


Abb. 21 Alignment *ERG4* von CBS138 mit CG22. Die Mutation an Position 158 führt zu einer kompletten Abwandlung der Sequenz und somit zum Funktionsverlust von *ERG4*.

3.5 Sterolanalyse

Da die für die Sterolsynthese notwendigen Enzyme durch die Gene der *ERG* Familie kodiert werden, kann es durch den Ausfall bestimmter *ERG* Gene durch Mutationen zu einem abweichenden Endprodukt der Stoffwechsellkaskade kommen. Durch die Mutationen der klinischen Isolate CG22 und CG56 kam es zu einer Veränderung der Sterolzusammensetzung innerhalb der Zellmembran. Der daraus entstandene verminderte Anteil von Ergosterol könnte eine Erklärung zum Resistenzverhalten der Pilze liefern. Da einige Enzyme instabil sind und nur schwer nachgewiesen werden können, wurden die Zwischenprodukte durch Gas Chromatographie-EI-Massen-Spektrometrie (GC-EI-MS) analysiert. [50] Eine verändertes Verhältnis der Sterolzwischenprodukte lässt auf eine Veränderung der Genregulation schließen. Abbildung [22] zeigt das Verhältnis der Intermediate mit einer Farbcodierung im Vergleich zum Referenzstamm CBS138. Neben CG56 und CG22 wurde ebenso der Stamm CG78 analysiert, der als Borderline-Stamm aus den Analysen von Aldejohann et al. hervorging und erst in wiederholten Testungen als sensibel gegen Anidulafungin eingeordnet wurde. Abbildung [22] zeigt die Zusammensetzung der Zellmembran der verschiedenen Stämme. So bedeutet vier (gelb) einen deutlich höheren Anteil eines Stoffes als er im Referenzstamm CBS138 vorliegt. Gleichzeitig bedeutet 0, dass erheblich weniger dieses Stoffwechselprodukts im Isolat vorlag. So ist erkennbar, dass weder in CG56, CG78, noch in CG22 der Ergosterolgehalt der Norm entsprach.

3 Ergebnisse

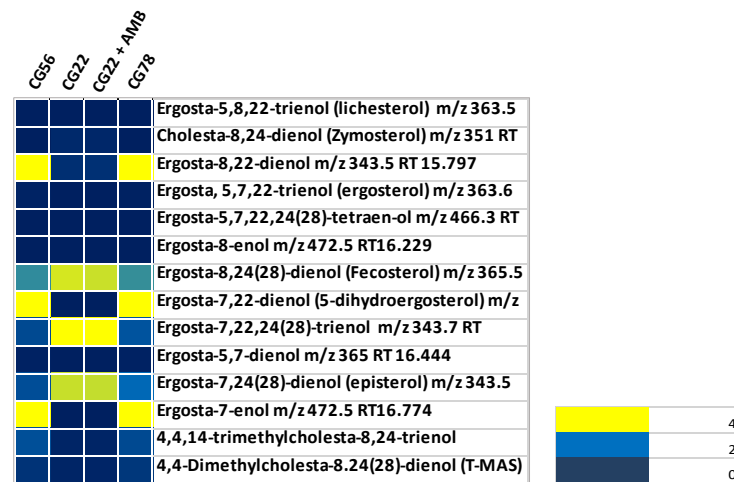


Abb. 22 Ergebnisse der Sterolanalyse für die Stämme CG22 +/- Amphotericin B, CG56 und CG78. Der Referenzstamm CBS138 ist nicht in der Abbildung sichtbar, da die Abbildung die Unterschiede zur Referenz darstellt. Farblich wird der erhöhte Gehalt des Intermediates dargestellt, so bedeutet hellblau eine Verdoppelung und gelb eine Vervierfachung im Vergleich zum Referenzstamm CBS138 (dunkelblau).

Bei CG56 lag eine Hemmung der Sterol C5-Desaturase (*ERG3*) vor, bei CG22 wurde ebenfalls die Sterol C5-Desaturase (*ERG3*) und zusätzlich die Sterol C24-Reduktase (*ERG4*) gehemmt. So kam es zu einer Umverteilung der Zwischenprodukte und einer neuen Zusammensetzung der Membran. [35] zeigt vereinfacht den Ergosterolstoffwechselweg und soll veranschaulichen welche Intermediate durch Ausfall von *ERG3* bzw. *ERG3* und *ERG4* entstehen. Durch den alleinigen Ausfall von *ERG3* (CG56) kommt es zu einer Umwandlung von Episterol zu Ergosta-7-enol durch *ERG4*, gefolgt von der Umwandlung zu Stellasterol mithilfe von *ERG5*. Anstatt des 77%-igen Ergosterolanteils fanden sich nur noch 4% Ergosterol in der Membran des CG56. Hauptbestandteil war mit 64% Stellasterol, gefolgt von 15% Ergosta-7-enol. Der Ergosterolgehalt des CG56 lag mit 4% dennoch noch über dem Ergosterolanteil des CG22, der nur noch 1% betrug. [23] Durch den zusätzlichen Funktionsverlust von *ERG4* konnte die Umwandlung von Episterol in Ergosta-7-enol nicht statt finden und es kam zur Bildung von Ergosta-7,22,24(28)-

3 Ergebnisse

trienol durch ERG5. Ergosta-7,22,24(28)-trienol lag im CG22 zu 85% vor, den restlichen Anteil machte das nicht weiter verstoffwechselte Episterol mit 13% aus. Abbildung 23 zeigt das Verhältnis der Zwischenprodukte im Vergleich zum CBS138. Es ist erkennbar, dass sich CG56 und CG78 identisch verhalten. Bei beiden klinischen Isolaten liegt eine Hemmung der Sterol C5-Destuarase (*ERG3*) vor. Zusätzlich zeigt sich, dass das Verhalten von CG22 mit Amphotericin B dem von CG22 ohne Amphotericin B entspricht. Der niedrige Ergosterolgehalt des CG22 ist eine mögliche Erklärung für dessen Resistenzverhalten gegen Amphotericin B. Interessanterweise scheinen die 4% Ergosterol im CG56 noch auszureichen, dass Amphotericin B dort binden kann und weiter wirksam ist, wobei bei 1% eine Resistenz gegen Amphotericin B vorliegt.

	CBS138	CG56	CG22	CG22 + AMB	CG78
Ergosta, 5,7,22-trienol (Ergosterol) m/z 363.6 RT 15.693	76,5%	4,0%	1,1%	1,2%	6,8%
Ergosta-7,22-dienol (Stellasterol) m/z 343.5 RT 15.917	1,2%	64,1%	0,0%	0,0%	63,9%
Ergosta-7,22,24(28)-trienol m/z 343.7 RT 16.235	0,0%	0,0%	84,6%	84,3%	0,0%
Ergosta-5,7-dienol m/z 365 RT 16.444	6,1%	0,4%	0,1%	0,1%	0,4%
Ergosta-7,24(28)-dienol (Episterol) m/z 343.5 RT 16.639	3,6%	6,5%	12,8%	12,9%	4,1%
Ergosta-7-enol m/z 472.5 RT 16.774	1,5%	15,0%	0,0%	0,0%	13,8%
4,4,14-trimethylcholesta-8,24-trienol (Lanosterol) m/z 393.5 RT 17.100	7,9%	8,2%	1,0%	1,1%	9,3%

Abb. 23 Zusammenfassung der Prozentualen Sterolzusammensetzung für die Stämme CBS138, CG22 +/- Amphotericin B, CG56 und CG78

3.6 Genexpression verschiedener klinischer *C. glabrata* Isolate

Nachdem die RNA der Stämme CBS138, CG12, CG22, CG40, CG56 und CG173 erfolgreich isoliert wurde und Quantität und Qualität mittels Bioanalyzer analysiert wurde, konnten weitere Versuche mittels RT-qPCR durchgeführt werden, mit denen die Transkriptionsfähigkeit verschiedener Gene untersucht wurde. Neben der bereits bekannten Borderline-Stämmen CG22, CG56 und dem sensitiven Referenzstamm CBS138 wurden noch drei weitere Stämme in die Analyse mit einbezogen. Bei CG12 handelt es sich um einen Amphotericin B-resistenten Stamm, der eine F625S Mutation im *FKS1* HS1 aufweist und auch in vorherigen Untersuchungen eine Resistenz gegen Anidulafungin, mit einer MHK von zwei, zeigte. Auch bei CG173 handelt es sich um ein Isolat, das eine Mutation (F659del) im ersten Hotspot des *FKS2* Gens besitzt, die zu einer Anidulafungin-Resistenz führte (MHK von 4 $\mu\text{g/ml}$). Als zusätzlichen sensiblen Stamm wurde CG40 gewählt, da bei diesem klinischen Isolat weder Mutationen noch Resistenzverhalten gegen Antimykotika nachgewiesen wurde. Zunächst wurden die Gene *FKS1* und *FKS2* analysiert, da diese im Zusammenhang zu Echinocandinresistenzen stehen. Die Ergebnisse enthalten nur eine Aussagekraft zur vorhandenen mRNA und nicht der tatsächlichen Umsetzung in funktionsfähige Proteine. Durch die Mutation im Start Codon von *ERG3* der DNA bei CG22 beispielsweise wird es nie zur Proteinsynthese kommen, obgleich die entsprechende mRNA für alle *ERG*-Gene nachweisbar war. Die Expression von Genen wurde mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode errechnet und mit einer Kontroll-RNA des CBS138 verglichen. Eine relative Expression zwischen Null und Eins bedeutet eine verminderte Expression im Vergleich zum Referenzstamm. Zahlen größer Eins bedeuten eine erhöhte Expression des Gens. Als Referenz Gen wurde zunächst *PDC1* verwendet.

3.6.1 *FKS1* und *FKS2* Expression verschiedener *C. glabrata* -Isolate

Zunächst sollte die Expression der *FKS1* und *FKS2* Gene der verschiedenen Stämme genauer analysiert werden. Die Versuche wurden jeweils mit drei biologischen Triplikaten durchgeführt und mit dem Referenzgen *PDC1* und einer Referenz RNA des CBS138 verrechnet. Die Ergebnisse der $\Delta\Delta CT$ -Werte der RT-qPCR sind in Abb. 24 dargestellt.

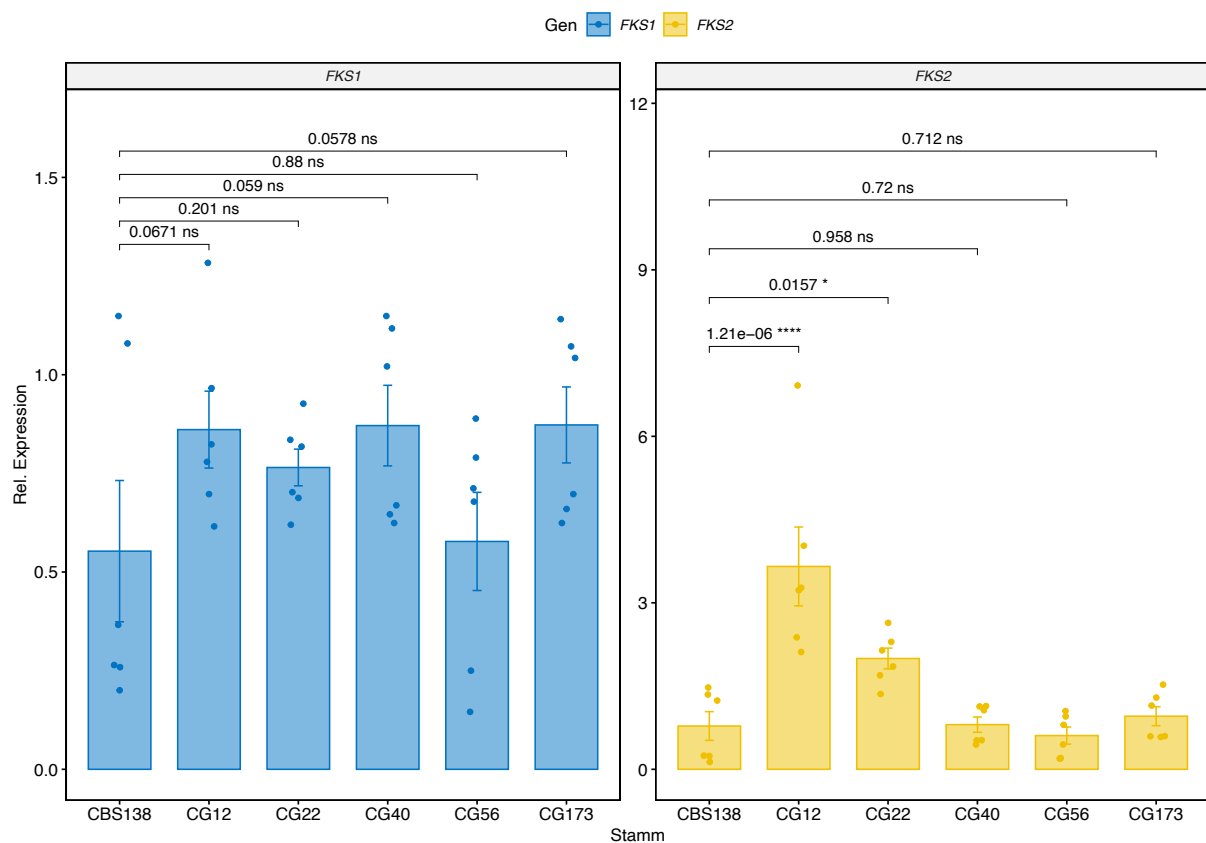


Abb. 24 *FKS1* und *FKS2* Expression der *C. glabrata* Isolate CBS138, CG12, CG22, CG40, CG56 und CG173. Blau gefärbt ist die Expression von *FKS1* dargestellt, gelb zeigt *FKS2*. Die mittels t-Test errechneten p-Werte und die entsprechenden Signifikanzen (ns = nicht signifikant, * = signifikant bei 5%, ** = signifikant bei 1%, *** = signifikant bei 0,1%, **** = signifikant bei 0,01%) stehen oberhalb der Klammern.

Abb. 24 zeigt die Expression verschiedener *C. glabrata* für die Gene *FKS1* und *FKS2*. Die Signifikanztestung wurde mittels t-Test ermittelt und immer im Vergleich zur Expression des Referenzstamms CBS138 errechnet. So zeigt sich, dass bei dem Amphotericin B-resistenten Stamm CG12 die Expression von *FKS2* signifikant erhöht war und der ebenfalls Amphotericin B-

resistente Stamm CG22 auch eine signifikant höhere Expression aufweist. Bei *FKS1* liegt weder bei CG12 noch bei CG22 eine signifikante Veränderung vor. Die sensitiven Isolate CBS138 und CG40 wiesen keine Veränderungen auf, genauso wenig wie der Borderline-Stamm CG56 und der AND-resistente Stamm CG173. Der ebenfalls multiresistente Stamm CG12 weist eine HS-Mutation in *FKS1* auf und verhält sich in Anwesenheit von Echinocandinen und Amphotericin B resistent. Da CG22 resistent gegen Echinocandine ist, aber keine Mutation in den *FKS*-Genen aufweist, kann die erhöhte Expression von *FKS2* ein Hinweis auf das Resistenzmuster sein.

3.6.2 Expression der *ERG*-Gene verschiedener *C. glabrata* Isolate

Die für die Sterolsynthese verantwortlichen *ERG*-Gene (*ERG2*, *ERG3*, *ERG6* und *ERG11*) wurden ebenfalls mittels RT-qPCR untersucht. Die Berechnung fand auch hier mit $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode und dem Referenzgen *PDC1* und der Referenz RNA des CBS138 statt.

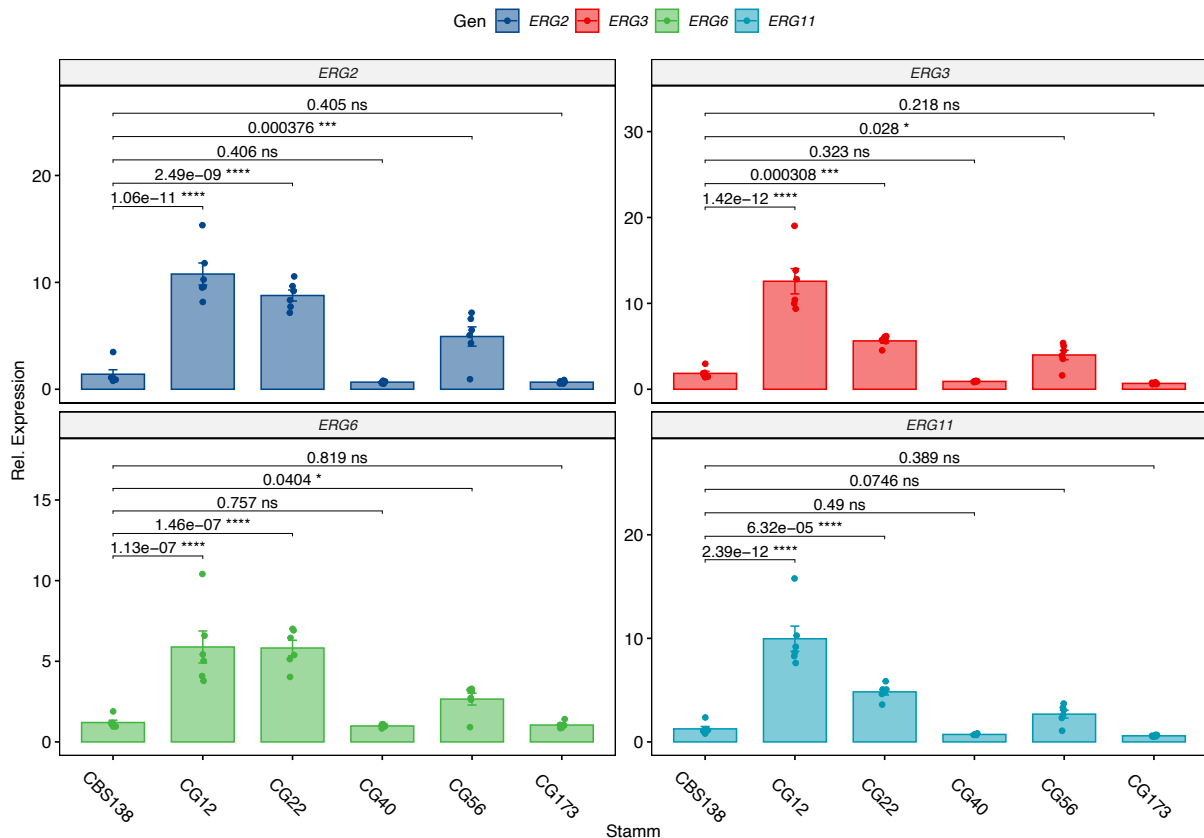


Abb. 25 *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* und *ERG11* Expression der *C. glabrata* Isolate CBS138, CG12, CG22, CG40, CG56 und CG173. Die mittels t-Test errechneten p-Werte und die entsprechenden Signifikanzen (ns, *, **, ***, ****) stehen oberhalb der Klammern.

Wie in Abb. 25 erkennbar, ist der sensitive Stamm CG40 unverändert in der Expression aller vier *ERG*-Gene, im Vergleich zum Referenzstamm CBS138. Auch der AND resistente Stamm CG173 weist keine erhöhte Expression auf. Bei dem Borderline-Isolat CG56 zeigt das Ergebnis eine signifikante Veränderung in *ERG2*, *ERG3* und *ERG6* und auch *ERG11* hat die Tendenz zur erhöhten Expression. Dies kann weitere Aufschlüsse auf die Ergebnisse der Sterolanalyse geben, da die Sterolzusammensetzung der Zellmembran von CG56 durch die Mutation in *ERG3*

nicht der Norm entsprach und die Erhöhung der Expression der verantwortlichen Gene eine Stressantwort des Pilzes ist. Die beiden Amphotericin B-resistenten Stämme CG12 und CG22 wiesen eine signifikant höhere Expression in allen *ERG*-Genen auf. Besonders *ERG2* und *ERG3* waren bei CG12 um das zehnfache erhöht. In CG22 und CG56 wurden Mutationen in *ERG3* nachgewiesen, die zu einem kompletten Funktionsverlust von *ERG3* führen und dennoch konnte hierfür ein erhöhter Anteil an mRNA gemessen werden. CG12 hatte eine Missensemutation in *ERG2*, die ebenfalls eine Funktionsveränderung hervorrief. Das klinische Isolat CG173, das ein resistentes Verhalten gegen Echinokandine aufwies, zeigte in der Expression der *ERG*-Gene keine signifikanten Veränderungen.

3.6.3 Genexpression von *C. glabrata*-Mutante *upc2BΔ*

Neben den klinischen *C. glabrata* Isolaten wurde die RT-qPCR auch mit einem nach Schwarzmüller et. al [58] konstruierten Deletionsstamm durchgeführt. Hierfür wurde ein Stamm verwendet, dessen *UPC2B* Gen deletiert wurde. *UPC2*-Gene in *C. glabrata* sind Transkriptionsfaktoren, die in die transkriptionale Regulation der Ergosterolsynthese involviert sind [59].

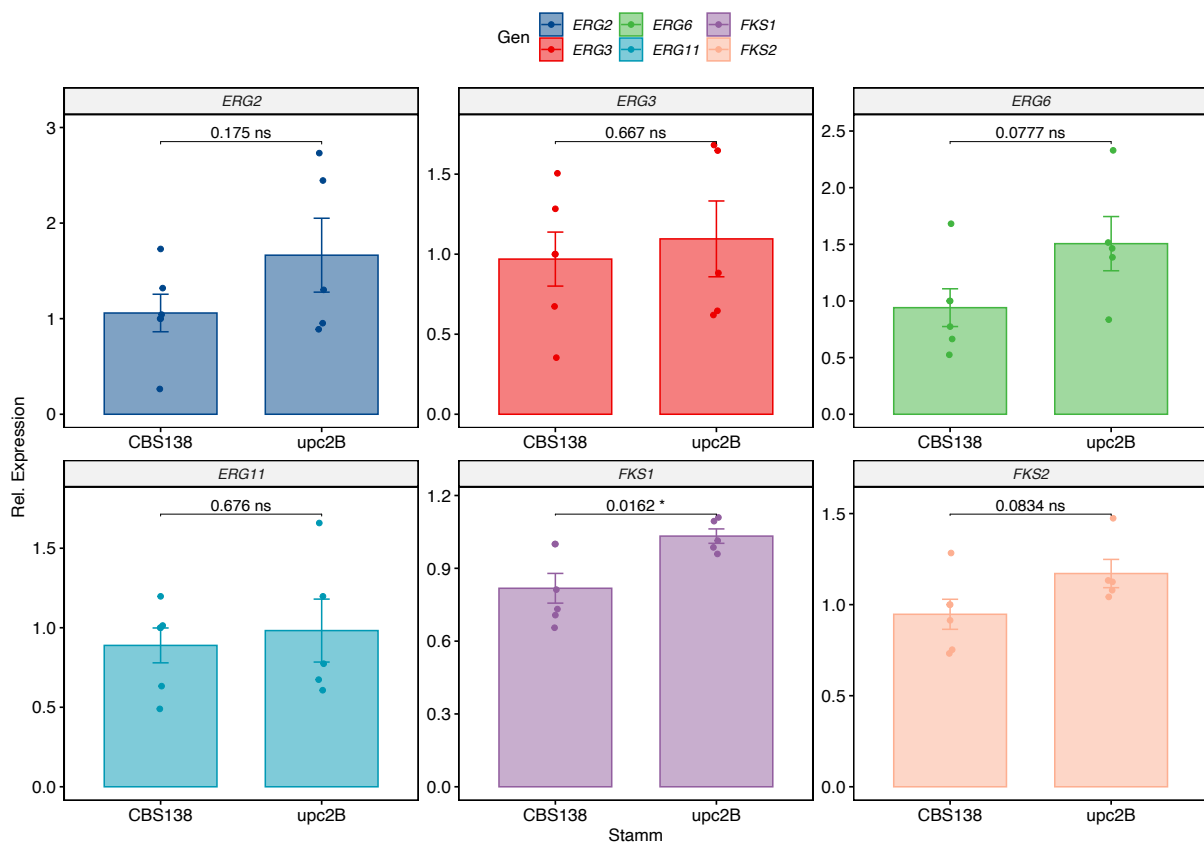


Abb. 26 Genexpression von *C. glabrata*-Mutante *upc2B* im Vergleich zu CBS138 für die Gene *ERG2*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG11*, *FKS1* und *FKS2*. Die mittels t-Test errechneten p-Werte und die entsprechenden Signifikanzen (ns, *, **, ***, ****) stehen oberhalb der Klammern.

Die Ergebnisse in Abb. 26 zeigen die Expressionen der *upc2BΔ*-Mutante im Vergleich zum Referenzstamm CBS138 für die *ERG*-Gene: *ERG2*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG11*, sowie für *FKS1* und *FKS2*. Hier zeigt sich die generelle Tendenz einer erhöhten Expression im Vergleich zum Referenzstamm CBS138. Nur die Expression von *FKS1* ergab eine signifikante Erhöhung der Expression, während die Ergebnisse für die übrigen Gene nicht signifikant waren. Dennoch müssen

für aussagekräftigere Thesen weitere Versuche mit einer größeren Anzahl an Versuchen durchgeführt werden, da die Standardabweichung für alle geprüften Gene sehr groß ist. In zukünftigen Versuchen soll vor allem auch die Deletion von *upc2A* untersucht werden. Die Erstellung der Genmutante ohne Funktion von *upc2A* hätte den Untersuchungsrahmen innerhalb der vorliegenden Arbeit gesprengt.

3.6.4 Veränderungen der Expression nach Kultivierung mit Anidulafungin

Nachdem durch das Erstellen von Wachstumskurven ein Grenzwert identifiziert werden konnte, bei dem der sensitive Stamm CBS138 auch unter der Anwesenheit von Anidulafungin (AND) noch wachsen konnte, wurde die RNA isoliert, nachdem die Stämme über Nacht angezüchtet wurden und dann erneut für eine bzw. vier Stunden mit 0,03g/ml AND inkubiert wurden. Dies wurde mit den Stämmen CBS138 und CG56 in Triplikaten durchgeführt. Parallel hierzu wurde die RNA auch von unvorbehandelten Triplikaten (zu den selben Zeitpunkten) mitgeführt. Anschließend wurde die *FKS1* und *FKS2* Expression mittels RT-qPCR und $\Delta\Delta CT$ Berechnung erfasst.

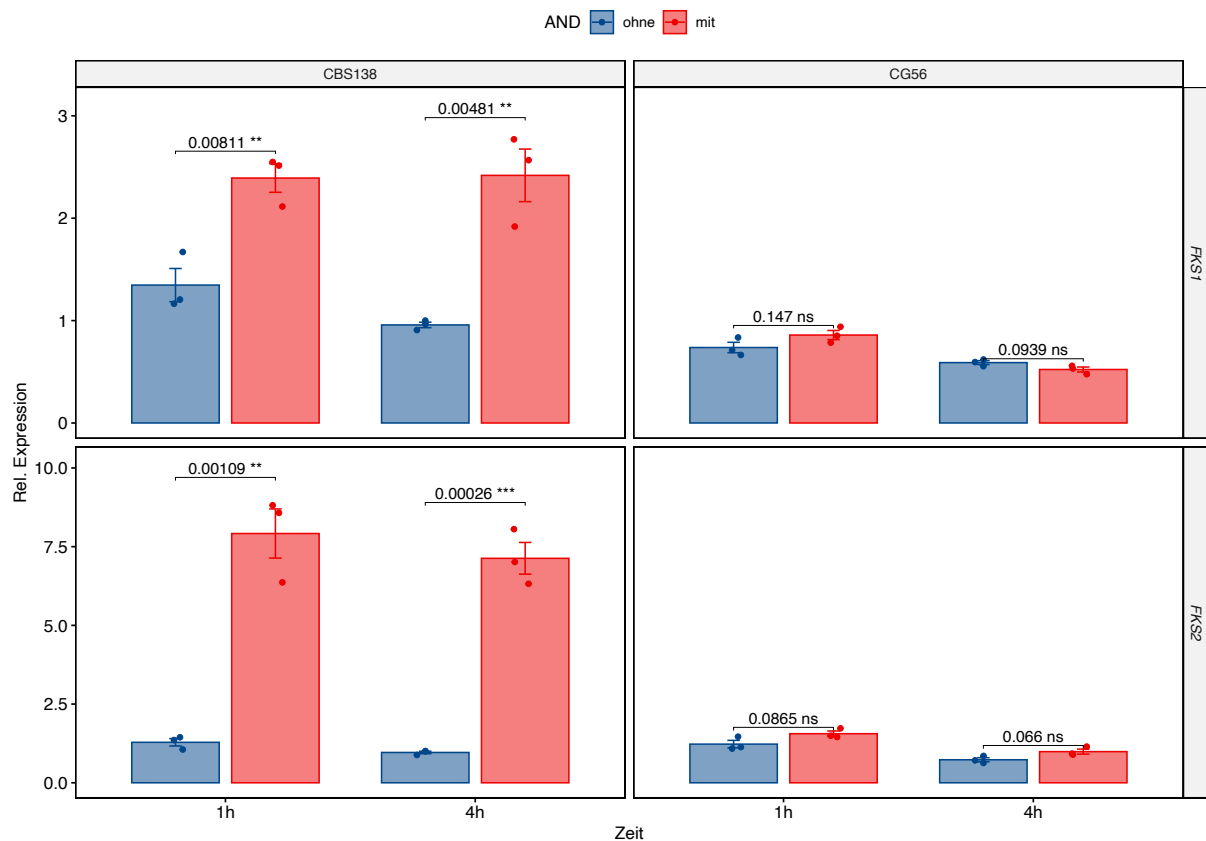


Abb. 27 Expression von *FKS1* und *FKS2* in CG56 und CBS138 nach 1h und 4h Inkubation mit und ohne Anidulafungin. Blau zeigt die Expression nach Inkubation mit 0,03g/ml AND, Rot stellt die Expression ohne AND dar. Die mittels t-Test errechneten p-Werte und die entsprechenden Signifikanzen (ns, *, **, ***, ****) stehen oberhalb der Klammern und beziehen sich auf den Unterschied zwischen der Inkubation mit und ohne AND.

Die Ergebnisse zeigen die Expression der Stämme mit und ohne Einfluss von AND und die statistische Auswertung mittels t-Test. [27] Eine statistische Signifikanz ergibt sich beim Referenzstamm CBS138 für beide Gene *FKS1* und *FKS2* und zeigt damit eine deutlich erhöhte Expression in Gegenwart von AND im Vergleich zum unbehandelten Stamm. Es errechnete sich eine Expressionserhöhung von *FKS2* bei CBS138 um den Faktor sieben in Anwesenheit von Anidulafungin. Nach genauer Beurteilung der Daten des Referenzstammes CBS138 wurde jedoch klar, dass die direkten CT-Messwerte vor allem beim Housekeeping Gene *PDC1* ungewöhnlich hoch waren. Dies führt bei der Berechnung des $\Delta\Delta$ CT- Wertes zu einer Verfälschung der Aussage über die Expression der *FKS*-Gene. Die vorliegenden Ergebnisse bringen also die Erkenntnis, dass selbst eine geringe Konzentration von AND, unter welcher ein sensitiver Stamm noch ungehindert wächst, eine Stressreaktion innerhalb der Zellen auslöst, durch die die Expression von *PDC1* reduziert wird. Für die Beurteilung und Berechnung der Gene *FKS1* und *FKS2* Gene war ein stabileres Housekeeping Gen nötig.

Ein 2021 veröffentlichtes Paper von Garcia-Rubio et al. befasste sich mit der Rolle von Mitochondrien in echinocandintoleranten Zellen und führte RT-qPCRs mit Genen durch, die vor allem in der Reaktion auf Oxidativen Stress eine zentrale Rolle spielen. [60] Hierbei wurde *RDN5.8* als Housekeeping Gen verwendet. Dieses und weitere Gene im genannten Paper sollten im Ragnab der vorliegenden Arbeit zusätzlich getestet werden. Die Gene der oxidativen Stressantwort und deren Regulorgene *CTA1*, *GRX2*, *MSN2*, *MSN4*, *SOD2* und *YAP1* wurden mit und ohne Anwesenheit von 0,03g/ml Anidulafungin nach einer Inkubationszeit von vier Stunden mittels RT-qPCR analysiert und anschließend mit dem Gen *RDN5.8* verrechnet. Auch hierfür wurde die $\Delta\Delta$ CT-Methode angewendet. Zusätzlich wurden die $\Delta\Delta$ CT-Werte von *PDC1* und *FKS1* und *FKS2* mit dem Housekeeping Gen *RDN5.8* kalkuliert und ebenfalls in die Graphik mit aufgenommen.

3 Ergebnisse

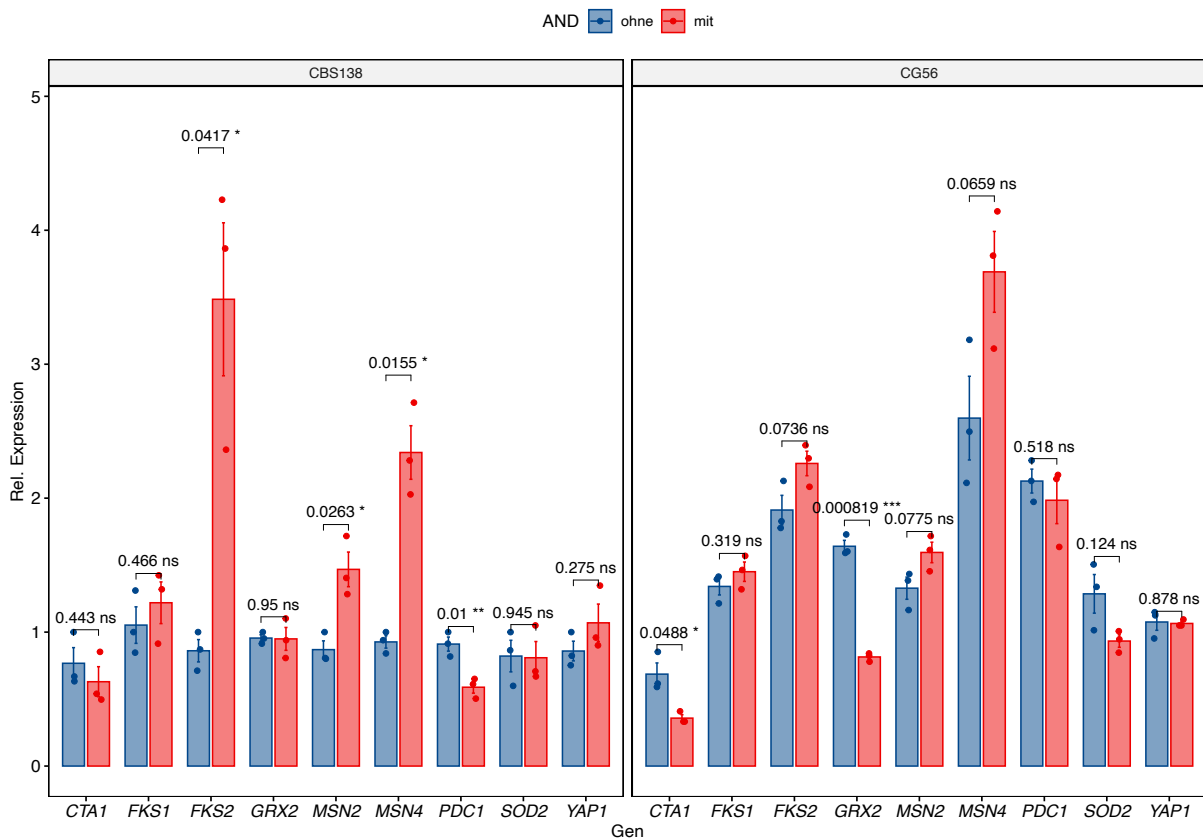


Abb. 28 Darstellung der Expression verschiedener Gene mit *RDN5.8* als Referenzen für die Analyse der für 4h mit 0,03g/ml Anidulafungin vorbehandelten Kulturen CBS138 und CG56. Die Expression der Gene *PDC1*, *FKS1/FKS2* sowie *CTA1*, *GRX2*, *MSN2*, *MSN4*, *SOD2* und *YAP1* wird rot mit AND-Vorbehandlung und blau ohne AND dargestellt. Die mittels t-Test errechneten p-Werte und die entsprechenden Signifikanzen (ns, *, **, ***, ****) stehen oberhalb der Klammern und beziehen sich auf den Unterschied zwischen der Inkubation mit und ohne AND.

Abb. 28 zeigt die Veränderungen in der Genexpression im Vergleich mit und ohne Anidulafungin bei einem sensitiven und einem Echinocandin-resistenten *C. glabrata* Stamm. Der sensitive Stamm CBS138 zeigt eine signifikante Reduktion der relativen Expression bei dem im vorherigen Versuch verwendeten Housekeeping Gen *PDC1* und verifiziert hiermit die dringende Notwendigkeit eines stabilen Housekeeping Gens. Die Expression von *FKS2* ist auch mit Verwendung des neuen Housekeeping Gens bei CBS138 deutlich erhöht, wobei CG56 weiterhin unverändert bleibt. *FKS2* steht im direkten Zusammenhang mit Echinocandinresistenz und eine Hochregulierung des Gens in Anwesenheit von AND deutet darauf hin, dass die Hochregulierung des Gens Grundlage für die Entstehung von Mutationen sein kann. Zusätzlich wird

MSN4 vermehrt exprimiert, was ein weiteres Indiz für eine Stressantwort des Pilzes auf den Stressmediator AND ist. Auch der anidulafunginresistente Stamm CG56 zeigt die Tendenz das Gen *MSN4* vermehrt zu exprimieren, während die Expression bei Zugabe von Anidulafungin zu CG56 bei *GRX2* signifikant niedriger wird. Auch *CTAI* zeigt eine signifikant verminderte Expression. Generell lässt sich keine klare These formulieren, da zu wenig Versuchswiederholungen durchgeführt worden sind. Dennoch scheint *RDN5.8* deutlich stabiler als *PDC1* und ist als Housekeeping Gen besser geeignet. Die *PDC1* Expression des CBS138 mit Anidulafungin zeigt deutlich wie instabil das ursprünglich verwendete Housekeeping Gen ist. Auch für zukünftige Projekte ist es essentiell die CT Werte des Housekeeping Gens gewissenhaft zu kontrollieren, sodass Fehlkalkulationen vermieden werden.

3.7 Stresstestung verschiedener klinischer *C. glabrata* Isolate

Neben der Resistenztestung wurden die klinischen *C. glabrata* Stämme auch auf ihre Reaktion auf andere Stressmediatoren getestet. Neben den bereits erwähnten Stämmen CG22 und CG56 wurde neben dem Referenzstamm CBS138 auch CG12 analysiert. Für das Resistenzverhalten gegenüber oxidativen Stress wurde 1 mM bzw. 5 mM Menadion in YPD bzw. SDG Platten gelöst und die Stämme in einer Verdünnungsreihe aufgetropft. SDG ist ein Minimalmedium für Candidakulturen während YPD ein Vollmedium ist. Abb. 29 zeigt, dass alle vier Stämme auf YPD Medium bei 1 mM Menadion noch mit einer Konzentration von 10^{-4} wuchsen, während sie auf SDG Medium nur unverdünnt angezüchtet werden konnten. CG22 und CG12 wuchsen unter Oxidativem Stress und auf Minimalmedium besser als CG56 und CBS138. Bei einer Konzentration von 5 mM Menadion spielte das Nährmedium eine untergeordnete Rolle, da dort alle Stämme nur unverdünnt wuchsen. Auch bei Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch DTT war der Unterschied zwischen den Medien YPD und SDG erkennbar. Zwischen den Konzentrationen 1 mM und 5 mM DTT zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen *C. glabrata* Stämmen.

3.7.1 Verhaltenstestung bei verschiedenen Stressmediatoren

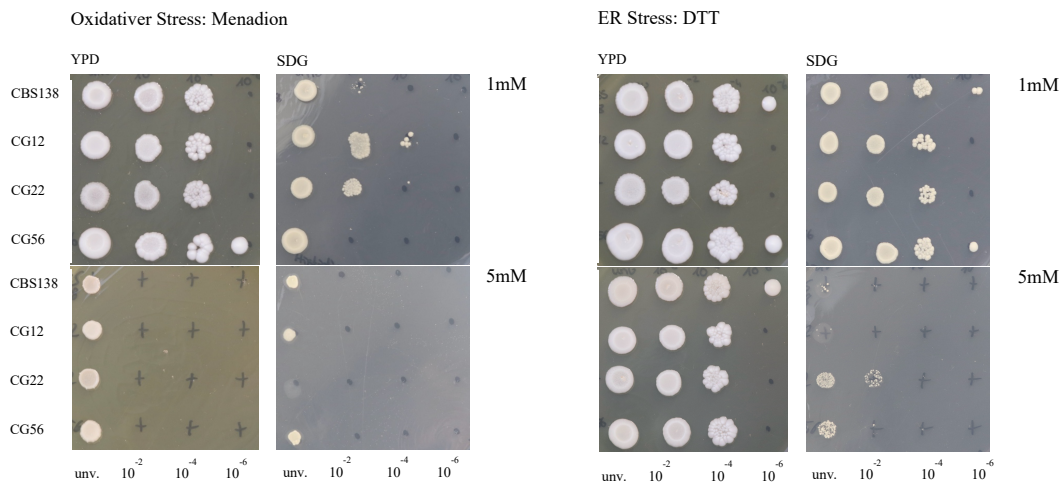


Abb. 29 Stresstestung: oxidativer Stress durch 1 mM und 5 mM und DTT sowie ER Stress durch 1 mM und 5 mM DTT auf YPD und SDG Agarplatten mit den Stämmen CBS138, CG12, CG22, CG56.

Um das Verhalten der *C. glabrata* Stämme auf Wärme zu analysieren wurden unterschiedliche Stresstestungen durchgeführt. Zunächst wurden die Stämme 15 min bei 50°C inkubiert und anschließend auf eine YPD Platte getropft. Abb. 30 zeigt rechts oben, dass CG56 schon bei einer Konzentration von 10^{-4} nicht mehr wachsen konnte. Durch Hitzestress sollte eine erhöhte Körperkerntemperatur simuliert werden und die *C. glabrata* Stämme wurden 48h bei 42°C angezchtet. CG12 zeigte kaum noch Wachstum selbst im unverdünnten Zustand und auch CBS138 wuchs nur unverdünnt, wobei CG22 noch Wachstum bei einer Konzentration von 10^{-6} aufwies. CG56 und CG22 zeigen eine erstaunliche Toleranz für eine konstante Hitzeeinwirkung von 42°C über 48 h hinweg, im Vergleich zu CBS138. CG56 zeigte eine bessere Resistenz gegenüber dauerhafter Hitzeeinwirkung im Vergleich zu einem kurzen Hitzeschock.

3 Ergebnisse

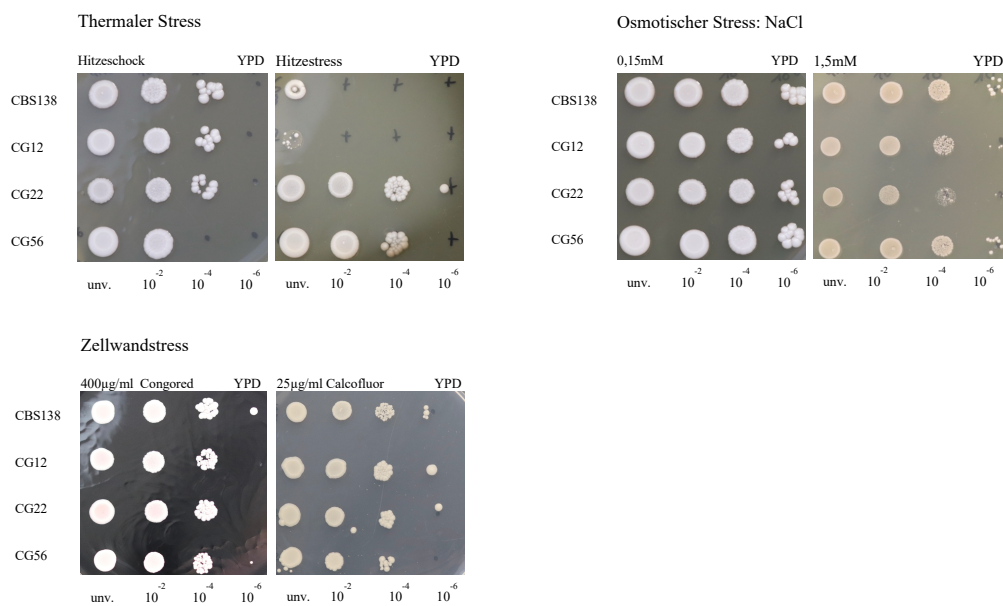


Abb. 30 Stresstestung: Thermaler Stress durch Hitzeschock (15 min bei 50 °C) und Hitzestress (48h bei 42 °C), Zellwandstress durch Congored und Calcofluor und osmotischer Stress durch 0,15 mM und 1,5 mM NaCl auf YPD Agarplatten mit den Stämmen CBS138, CG12, CG22, CG56.

Auf osmotischen Stress ausgelöst durch NaCl zeigten alle Stämme ein ähnliches Wachstumsbild und es ergab sich einzig verminderten Wachstum bei Erhöhung der NaCl Konzentration von 0,15mM auf 1,5mM. Auch die Reaktion auf Zellwandstress durch Congored oder Calcofluor war bei den vier *C. glabrata* Stämmen sehr ähnlich. Einzig CG56 konnte nur bis zu einer Konzentration von 10^{-4} wachsen.

3.7.2 Verhaltenstestung bei doppelter Stressexposition

Neben der einfachen Reaktionsanalyse von Stressemediatoren auf die *C. glabrata* Stämme sollte auch das Stressverhalten des multiresistenten CG22 geprüft werden, der zuvor über Nacht mit Amphotericin mit 1 $\mu\text{g/ml}$ angezüchtet wurde. Abb. 28 und Abb. 29 zeigen, dass ein identisches Verhalten von CG22 und CG22 + Amphotericin B vorliegt.

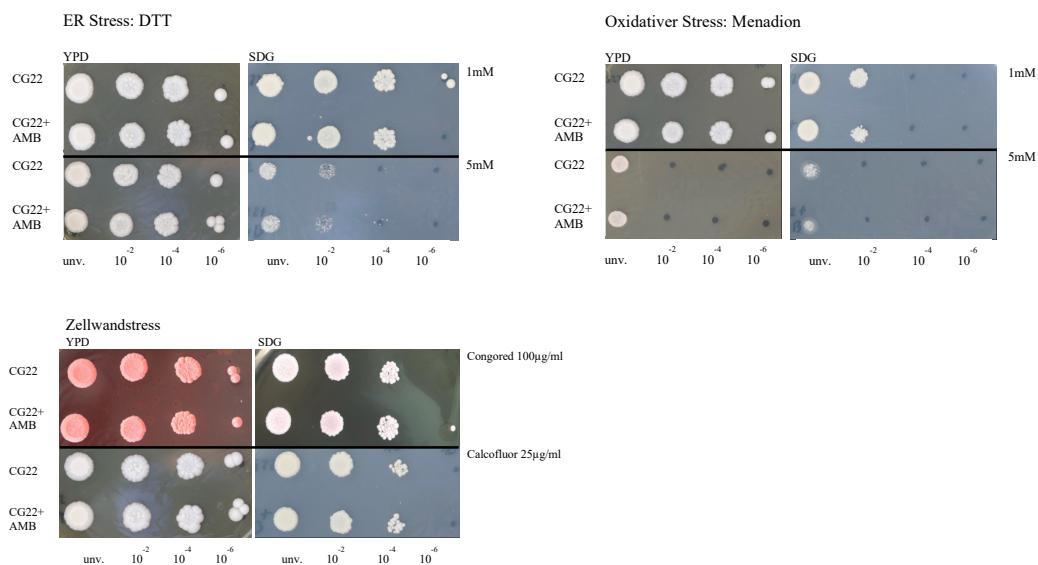


Abb. 31 Doppelstresstestung: CG22 mit Amphotericin B inkubiert und anschließende Testung von ER Stress durch DTT, oxidativem Stress durch Menadion und Zellwandstress durch Congored und Calcofluor

Dies deutet darauf hin, dass Amphotericin keinerlei Auswirkung auf das Wachstum von CG22 hat und auch zusätzliche Stressexpositionen das Wachstum nicht stärker beeinflussen als es bei CG22 ohne Amphotericin B der Fall ist. Dies bedeutet aber auch, dass bei einem resistenten *C. glabrata* Stamm weitere Stressmediatoren nicht schneller zu einem Absterben des Keims führen.

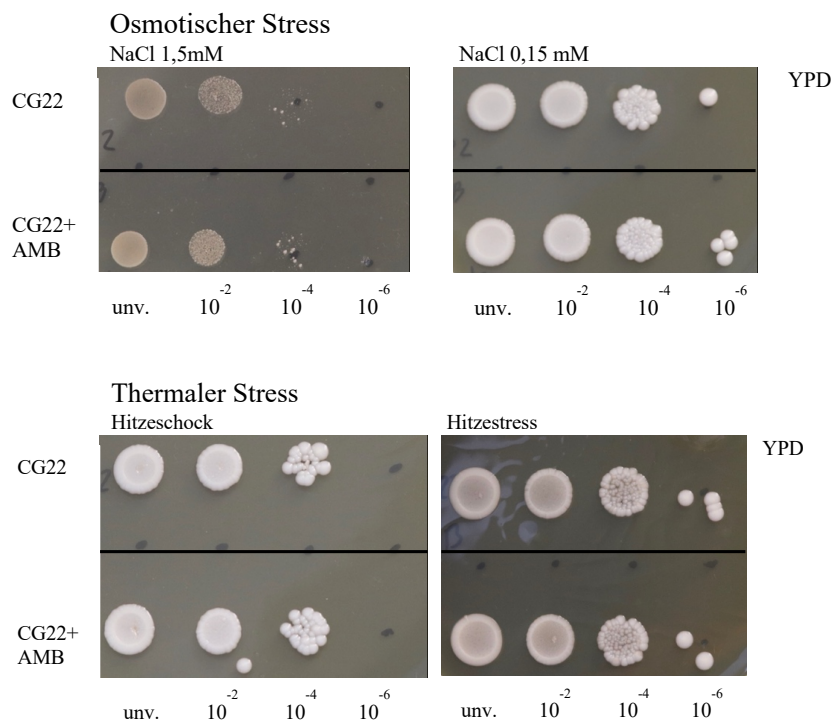


Abb. 32 Doppelstresstestung: CG22 mit Amphotericin B inkubiert und zusätzlichem osmotischem Stress durch 0,15 mM und 1,5 mM NaCl auf YPD Agarplatten und thermalem Stress durch Hitzeschock (15 min bei 50 °C) und Hitzestress (48h bei 42 °C)

Neben CG22 wurden auch die Stämme CG12, G56, und CBS138 in Doppelstresstestungen mit Myriocin und Amphotericin B geprüft. Myriocin ist ein Sphingolipid-Synthese-Inhibitor und wirkt somit antifungal. [61] Die Grundlagenforschung des Sphingolipid Stoffwechsels fand zunächst an der Bäckerhefe *S. cerevisiae* statt und kann auf viele weitere Hefezellen übertragen werden. [62] Der Einfluss von Myriocin auf *C. glabrata* wurde in vergangenen Forschungsprojekten als eher gering eingeschätzt. Abb. [33] zeigt, dass sich die MHK des CBS138 von 0,125 auf 0,0132 verändert. Abb. [34] zeigt den Einfluss von Myriocin auf CG12, CG22 und CG56.

3 Ergebnisse

	CBS138	Methanol	250nM Myriocin
CBS138 nach 48h Amphotericin B			
MHK (µg/ml)	0,125	0,125	0,0132

Abb. 33 Doppelstresstestung CBS138 mit Amphotericin B und 250 nM Myriocin in Methanol gelöst. Links ist der Etest als Einzeltestung dargestellt, in der Mitte die Methanolkontrolle und rechts der Etest mit Amphotericin B und zusätzlich 250 nM Myriocin. Die gemessenen MHK Werte stehen unterhalb.

	CG12	Methanol	250nM Myriocin	CG22	Methanol	250nM Myriocin	CG56	Methanol	250nM Myriocin
Amphotericin B									
MHK (µg/ml)	2	2	-----	12	12	8	0,38	0,38	0,25

Abb. 34 Doppelstresstestung der klinischen Isolate CG12,CG22,CG56 mit Amphotericin B und 250 nM Myriocin in Methanol gelöst. Links ist der Etest als Einzeltestung dargestellt, in der Mitte die Methanolkontrolle und rechts der Etest mit Amphotericin B und zusätzlich 250 nM Myriocin. Die gemessenen MHK Werte sind unterhalb aufgeführt.

Während CG22 und CG56 keine großen Veränderungen in ihrer MHK aufwiesen, zeigte

CG12 absolut kein Wachstum mehr (Abb. 34). Auch hier sind weitere Versuche notwendig, denn der Sphingolipidstoffwechsel scheint ein vielversprechender Ansatz für neue Antimykotikatherapien zu sein.

4 Diskussion

In den letzten Jahren kam es zu einer erhöhten Inzidenz von Pilzinfektionen und steigenden Zahlen von Multidrug-resistenten *C. glabrata*-Stämmen. [20, 43, 2, 63] Das vermehrte Aufkommen von Multidrug-Resistance (MDR) in *C. glabrata*, auch wenn es noch selten vorkommt, ist besorgniserregend. Dies gilt vor allem deswegen, weil die Anwendung von Echinocandinen und Triazolen in den letzten zehn Jahren erheblich zugenommen hat und Echinocandine Therapiemittel der Wahl sind. [43, 64] Bedingt durch die limitierten therapeutischen Alternativen ist die Mortalitätsrate vor allem für *C. glabrata* hoch (60%). [65, 64] *C. glabrata* Spezies, die resistent gegen zwei oder drei Antimykotika sind, limitieren die Therapieoptionen drastisch. Deswegen sind eine schnelle Identifikation der Spezies, Empfindlichkeitsprüfungen der Antimykotika und die Entwicklung neuer Medikamente zwingend notwendig um die Sterblichkeitsrate durch Candidämien reduzieren zu können. [9] Auch die Breitbandgabe von Echinocandinen als Erstlinientherapie gegen Candidämien führt zu einem erhöhtem Aufkommen resistenter *C. glabrata*-Stämme, da das haploide Genom schnelle Mutationen ermöglicht, welche dann zu Therapieversagen führen. [45] Auch ist eine vorangegangene Echinocandin-Therapie signifikanter Risikofaktor für eine FKS-Mutation, welche wiederum den Therapieerfolg mindert, da eine Mutation in den Genen *FKS1* und *FKS2* mit Echinocandinresistenz assoziiert wird. [65, 64] Die mannigfaltige genetische Diversität von klinischen *C. glabrata*-Isolaten führt wahrscheinlich dazu, dass *C. glabrata* in der Lage ist, multiplen Stressmediatoren (wie Antimykotika) standzuhalten. So weisen die Hälfte der in den Vereinigten Staaten gesammelten *C. glabrata*-Stämmen eine Mutation im DNA-mismatch-repair-Gen *MSH2* auf, was mit erhöhten Mutationsraten korreliert. [20]. Wenn Pilze Stressmediatoren wie Temperatur-, oxidativen oder osmotischen Veränderungen oder auch antimykotischen Medikamenten ausgesetzt sind, aktivieren sie eine Stressantwort um die schädlichen Wirkungen abzuschwächen und den Tod zu vermeiden. [20] Daraus lässt sich schließen, wie schwierig es ist, invasive Candidämien erfolgreich zu behandeln, da therapeutische Alternativen fehlen und oft auf Amphotericin B zurückgegriffen werden muss, das jedoch durch seine Nephrotoxizität weitere limitierende Faktoren liefert. [64] Zusätzlich treten auch immer häufiger *C. glabrata*-Stämme mit Resistenzverhalten gegen Amphotericin B auf. [66] Auch

deshalb ist es zwingend notwendig in die Weiterentwicklung neuer antifungaler Medikamente zu investieren um neue therapeutische Mittel und Wege zu finden. Vor allem die Früherkennung von Resistenzen muss in die Diagnostik des klinischen Alltags integriert werden, da jede fehlgeschlagene Antimykotikatherapie die Entstehung von weiteren Mutationen begünstigt [67].

4.1 *FKS*-HS Mutationen im Zusammenhang mit Echinocandin-Resistenzen

Der Zusammenhang zwischen Echinocandin-Resistenz und *FKS1* und *FKS2* HS Mutationen wurde mehrfach in der Literatur bestätigt und lässt sich auf einen Großteil der klinischen *C. glabrata*- Isolate anwenden, die ein solches Resistenzverhalten aufweisen. [68] Dabei handelt es sich um einen vielversprechenden Ansatz in der Früherkennung von Mutationen, da bis zu 85%, der Echinocandin-resistenten *C. glabrata*-Stämme eine Mutation in HS-Regionen von *FKS1* und *FKS2* aufweisen. [63, 45]

4.1.1 Ausschluss Mischkolonie der klinischen Probe des CG56

Der im ersten Teil der Arbeit analysierte Stamm CG56 fiel in Testungen durch Aldejohann et al. deswegen auf, weil er auf standardisierte Resistenztestungen mittels Micronaut und YeastOne ein Resistenzverhalten gegen Anidulafungin zeigt. Dennoch ergaben wiederholte Analysen keine Mutation in den HS-Regionen von *FKS1* und *FKS2* feststellen. Zur genauen Betrachtung der Ursache der Resistenz wurden weiterführende Testungen durchgeführt. Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass es sich um keine Mischkultur verschiedener Keime handelt. Daher wurden zehn Einzelkolonien angezüchtet und in Mehrfachtestung analysiert, ob ihr Verhalten identisch und reproduzierbar ist. Dieser Aspekt scheint zunächst trivial, ist aber von großer Bedeutung, da nur auf diesen Weg ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um keine Mischkultur handelt, sondern eine Reinkultur vorliegt. Da es sich bei CG56 um eine klinische Probe des NRZMyk handelt und diese aus einer Blutprobe gewonnen wurde, ist die Reinheit der Kultur nicht als selbstverständlich anzusehen. So wurden die Empfindlichkeitsprüfungen mittels Micronaut und Etest mit zehn Kolonien und zusätzlich der CG56-Probe in Doppeltestung durchgeführt und es zeigte sich, dass die MHKs im Rahmen der Messungengenauigkeit übereinstimmten. Ebenso

musste das Fehlen einer HS-Mutation in den *FKS1* und *FKS2* HS-Regionen für alle Einzelkolonien ausgeschlossen werden. Auch hier konnte ein einheitliches Verhalten verifiziert werden. Wie viele unterschiedliche Einzelkolonien für den 100%igen Ausschluss einer Mischkultur notwendig sind, ist nicht definiert. Dennoch sind die Ergebnisse vielversprechend und eine Testung mit zehn Einzelkolonien scheint ausreichend, um die vorliegenden Thesen zu bestätigen.

4.1.2 Genomsequenzierung: Ergebnisse der *FKS*-Gene

C. glabrata hat sich erfolgreich adaptiert und ist in der Lage, menschliche mucosale Membranen zu kolonisieren und in vivo Veränderungen standzuhalten und zu überleben, auch unter antifungaler Therapie. [68, 69] Healey et al. veröffentlichten 2018 ein Multistep-Modell für die Entstehung von Echinocandin-Resistenzen, beginnend mit generellem Zellstress, Anpassung an Medikamente und Ausbildung von Toleranzen bis zur genetischen Veränderung (*FKS* Mutationen). So wurde beschrieben, dass, obwohl Echinocandine als fungizid gelten und die große Mehrheit der Zellen abtötet, ca 10^4 Zellen die Echinocandinzufuhr überleben und als angepasst gelten und somit als tolerant definiert werden können. Diese angepassten Zellen können so lange ausharren bis sich *FKS*-Mutationen bilden, die der Medikamentenwirkung standhalten und die Ursache klinischen Versagens darstellen. [68] Die komplette Genomsequenzierung von CG56 ergab eine *FKS2* Mutation Thr970Ile (Theronin wird zu Isoleucin) 48bp vor HS2 und eine Mutation in *FKS1* Lys1323Asn (Lysin wird zu Asparagin). Diese Mutationen konnten nur durch eine gesamte Genomsequenzierung analysiert werden und befinden sich außerhalb der HS-Regionen. Dies bedeutet, dass CG56 doch eine Mutation in den *FKS*-Genen aufweist und liefert somit eine Erklärung für das Resistenzverhalten des klinischen Isolates gegen Echinocandine. So scheint auch eine Mutation außerhalb der HS-Regionen in *FKS*-Genen zu Echinocandin-Resistenz führen und so scheint es sinnvoll, vor allem die unmittelbare Nachbarschaft der *FKS* HS-Regionen ebenfalls auf Mutationen zu untersuchen. Während die meisten *FKS*-Mutationen in der HS-Region liegen, können auch Mutationen in anderen Bereichen der Gene die Struktur oder Funktion des 1,3-beta-D-Glucan-Synthase-Komplexes beeinträchtigen und damit zu Echinocandin-Resistenz führen. Es wurde mehrfach in der Literatur berichtet, dass nicht-HS-Mutationen in

FKS-Genen bei verschiedenen *Candida*-Arten, einschließlich *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. albicans*, zu Echinocandin-Resistenz führen können. [70, 71, 72, 73]

4.1.3 Genexpression *FKS1/FKS2*

Bei der Analyse der Expression von *FKS1* und *FKS2* kam es unter normalen Bedingungen zu keinen nennenswerten Unterschieden zwischen dem Wild-Typ CBS138 und dem Echinocandin-resistenten Stamm CG56. Rodrigues et al. führten Versuche an der Biofilmmatrix von drei unterschiedlichen *C. glabrata*-Stämmen durch, indem Sie die Expression bestimmter Gene (u.a. *FKS1* und *FKS2*) nach Vorbehandlung mit verschiedenen Antimykotika analysierten. Vor allem die Vorbehandlung mit Micafungin führte zu einer erhöhten Expression der ausgewählten Gene. [74] Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von *FKS1* und *FKS2* und anderen stressassoziierten Gene nach Vorbehandlung mit Anidulafungin gemessen. Zunächst zeigten die Ergebnisse des sensitiven Stammes eine klar signifikante Hochregulation der *FKS1* und *FKS2* Gene im Vergleich zum resistenten Stamm. Diese Ergebnisse relativierten sich nach genauer Betrachtung, da das Housekeeping Gen *PDC1* beim sensitiven Stamm hochreguliert wurde und daraus in den Berechnung auch eine Hochregulation von *FKS1* und *FKS2* resultierte. Garcia-Rubio et al untersuchten *C. glabrata*-Stämme vor allem hinsichtlich der Rolle von Mitochondrien in Echinocandin-resistenten Zellen und führten Analysen zur Genexpression durch, nachdem eine Vorbehandlung mit Micafungin bzw. Caspofungin stattfand. Die verwendeten Gene spielen vor allem in der Reaktion auf Oxidativen Stress eine zentrale Rolle und wurden im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht. Als Referenzgen fungierte bei Garcia-Rubio et al. *RDN5.8* und wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. [60] Bereits Li et al. beschäftigten sich mit der Frage, welches Referenzgen am besten geeignet ist, wenn die Genexpression von Stämmen analysiert werden soll, die zuvor mit Azolen in Kontakt gekommen sind. Hier wurden die Untereinheiten der ribosomalen RNA *RDN5.8* als am besten geeignet bewertet, da die CT Schwan-
kungswerte unter 0,5 lagen und die Stabilität und Tauglichkeit hier am besten abschnitten. In jeder Genexpressionsstudie ist die Auswahl eines geeigneten Referenzgens essentiell, um Fehl-

interpretationen zu vermeiden und keine falschen Rückschlüsse zu ziehen. [75] Bei der Analyse der Genexpression mit und ohne Vorbehandlung mit Anidulafungin der vorliegenden Arbeit sind signifikanten Veränderungen nachgewiesen worden: Der sensitive Stamm CBS138 nach Exposition mit Anidulafungin zeigt Veränderungen in Stoffwechselprozessen, die auf eine Verarbeitung von Stress hinweist. Neben einer starken Hochregulation von *FKS2* ist eine erhöhte Expression bei *MSN2* und *MSN4* sichtbar, was auf eine erhöhte Stressreaktion hindeutet. *MSN2* und *MSN4* sind Proteine, die für die Expression einer breiten Palette von Genen als Reaktion auf verschiedene Arten von Stress verantwortlich sind, nicht aber für die Lebensfähigkeit unter normalen Bedingungen. Das *MSN2/4*-Regulon umfasst Gene für oxidativen Stress, Stoffwechsel und andere zytoprotektive Gene, was zu seiner Charakterisierung als Umweltstressreaktion führte. [76] Das Housekeeping Gen *PDC1* zeigte in den Untersuchungen signifikante Unterschiede, da es weniger exprimiert wurde, wenn CBS138 mit Anidulafungin inkubierte.

Der multiresistente Stamm CG56 zeigte signifikante Unterschiede in den Genen *CTA1* und *GRX2*, die eine geringere Expression nach Vorbehandlung mit Anidulafungin zeigten. Auch dies kann als Antwort auf eine Stressreaktion gedeutet werden. Glutaredoxine (*GRX*) sind hitzestabile Oxidoreduktasen, die als Wasserstoffdonatoren für die Ribonukleotidreduktion in *E. coli* entdeckt wurden. *GRX* spielen eine Rolle in vielen zellulären Prozessen, einschließlich Proteinfaltung und -regulierung, Reduktion von Dehydroascorbat, Schutz vor ROS und Schwefelstoffwechsel. Es gibt zwei klassische Dithiol-Glutaredoxine in Hefen, *GRX1* und *GRX2*, die unterschiedliche zelluläre Funktionen zu haben scheinen. Unterschiede in der Expression von *GRX1* und *GRX2* legen nahe, dass die beiden Isoformen unterschiedliche Rollen bei normalem Wachstum und unter Stressbedingungen spielen können und werden über stressreagierende *STRE*-Elemente reguliert. [76] *CTA1* ist ein stressinduziertes Gen in *Candida spp.*, das für die Produktion der Katalase A kodiert, einem Enzym, das eine wichtige Rolle bei der Neutralisierung von Wasserstoffperoxid spielt, einem reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der bei oxidativem Stress gebildet wird. Studien haben gezeigt, dass die Expression von *CTA1* in *Candida spp.* durch verschiedene Stressbedingungen wie oxidativen Stress, thermischen Stress, osmotischen Stress und durch Behandlung mit Antimykotika induziert werden kann. [77, 78, 79]

Um weitere Aussagen über die Veränderung der Genexpression nach Inkubation mit Anidu-

lafungin, treffen zu können, sind vor allem Testreihen mit mehr als drei Durchgängen notwendig um eine geringere Standardabweichung zu erlangen. Weiterführend sollte in zukünftigen Analysen eine Transkriptomanalyse der mit Anidulafungin vorbehandelten Stämme durchgeführt werden, um genauere Rückschlüsse ziehen zu können, welche Gene durch den Stressmediator Anidulafungin beeinträchtigt werden und wie sich das Verhalten zwischen sensitiven und resistenten Stämmen unterscheidet.

4.2 Sterolsynthesepathway als Angriffspunkt für Antimykotika

Der innerhalb der Pilze hochkonservierte Ergosterolbiosyntheseweg wurde zunächst in der Bäckerhefe *S.cerevisiae* untersucht und umfasst einen komplexen Ablauf von 25 Enzymen (siehe Abb. 3). Auch wenn ein standardisierter Ablauf beschrieben wurde, können verschiedene Enzyme am selben Substrat wirken, was die Anzahl der Intermediate deutlich erhöht. [80]

Azole, ebenso wie Allylamine, Thiocarbamene und Morpholine hemmen die Ergosterolbiosynthese, einen Stoffwechselweg, der in vielen Bereichen der Cholesterinbiosynthese von Säugetieren ähnelt. Azole hemmen die Cytochrom P450 Lanosterol-Demethylase, *ERG11* oder *Cyp51*, was ein essenzieller Schritt der Sterolsynthese ist. Die Inhibition von Erg11 resultiert im Austausch von Ergosterol durch methyliertes Sterol in der Plasmamembran [81]. Azole könnten auch noch ein weiteres Cytochrom P450 hemmen, dass für *ERG5* verantwortlich ist [82]. Da Erg11 Erg5 vorhergeht, scheint Erg11 aber das wichtigste Enzym für Azole darzustellen. Antimykotika haben ihre Wirksamkeit in den letzten Jahren bewiesen, in dem sie maßgeblich an der Genesung der Patienten beteiligt waren. Dennoch haben sich unglücklicherweise in Pilzen verschiedene Abwehrmechanismen gegen diese Wirkstoffe entwickelt. Diese Mechanismen sind an Resistenzgenen, Transportern und Angriffspunkten der Antimykotika nachgewiesen worden. Genomweite Studien zeigten die komplexen Regulationsmechanismen, die diesen genetischen und transkriptionischen Vorgängen zugrundeliegen und zu Resistenzen führen können. Generell ist die Inzidenz von Antimykotikaresistenzen in normalen sensitiven Pilzen moderat, vor allem im Vergleich zu Antibiotikaresistenzen. Dennoch lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen der Schluss ziehen, dass die verhältnismäßig geringe Anzahl an verfügbaren Wirkstoffen besorgniserregend ist. Weitere wissenschaftliche Forschungsprojekte zu diesem Thema sind dringend indiziert. [81]

4.2.1 Der veränderte Sterolsynthesepathway

Die Verstoffwechslung von Squalen zu Ergosterol läuft unter physiologischen Bedingungen durch den Einfluss von zehn Enzymen ab wie in Abb. 35 in blau eingerahmt dargestellt ist. Fällt die Funktion eines der Enzyme aus, kommt es nicht zum Stillstand der Kaskade, sondern zur Verschiebung des Stoffwechselweges zu anderen Intermediaten.

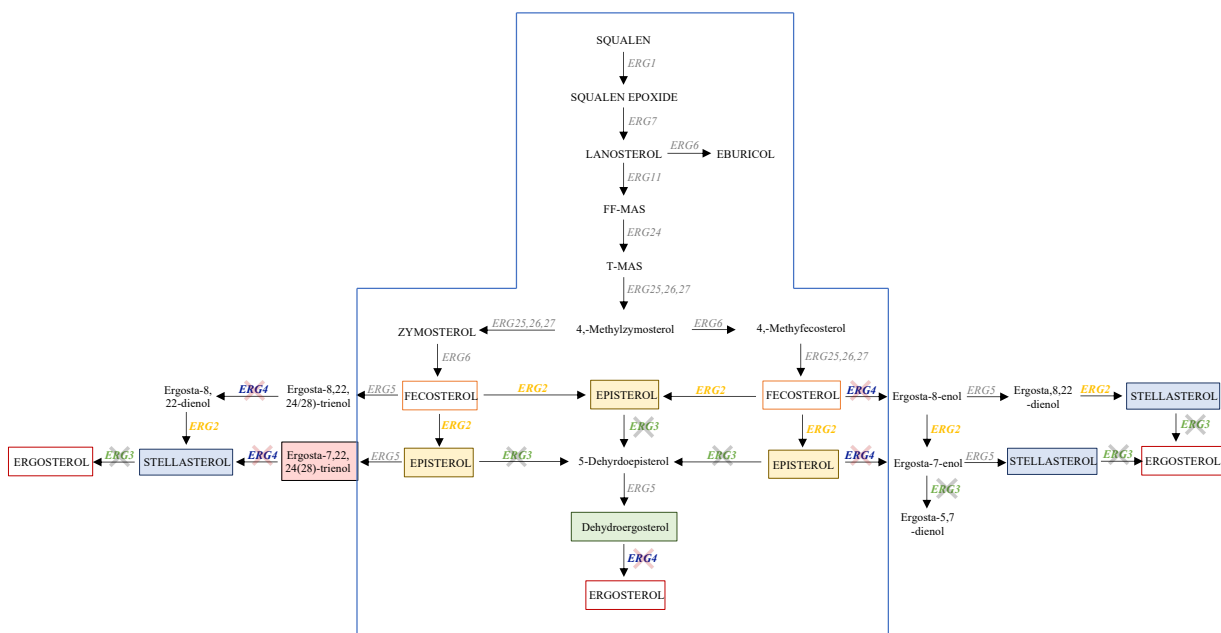


Abb. 35 Der Ablauf des Sterolsynthese Pathway bei Inaktivierung von *ERG3* und *ERG4*. In blau eingerahmt ist der physiologisch Ablauf gekennzeichnet, durch die Kreuze wird die Inaktivierung der Gene *ERG3* und *ERG4* dargestellt, auf den Pfeilen sind die Gene ersichtlich.

Abbildung 36 soll die Veränderungen des Sterolstoffwechselweges von CG22 und CG56 im Vergleich zu CBS138 darstellen. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Umwandlung von Episterol zu 5-Dehydroepisterol durch die Sterol C5-desaturase (*ERG3*), weiter zu Dehydroepisterol durch die Sterol C22-desaturase (*ERG5*) und abschließend zu Ergosterol durch die Sterol C24-reductase (*ERG4*). Fällt nur die Sterol C5-desaturase (*ERG3*) aus, so wird Episterol durch die Sterol C24-reductase zu Ergosta-7-enol und final zu Stellasterol durch die Sterol C22-desaturase. Liegt wie bei CG22 ein Defekt in *ERG3* und *ERG4* vor, so findet einzig die Umwandlung von Episterol zu Ergosta-7,22,24(28)trienol durch die Sterol C22-desaturase statt.

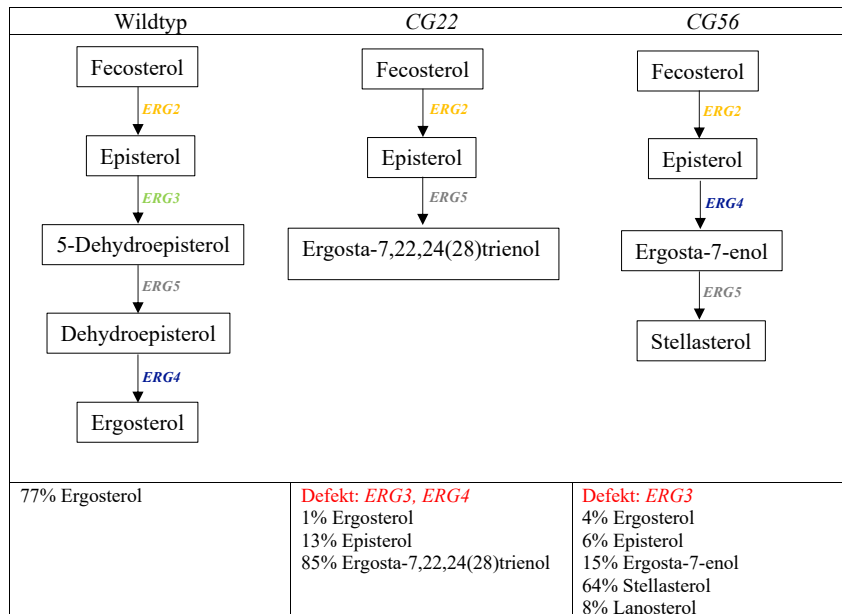


Abb. 36 Vergleich der Sterolpathways der klinischen Isolate mit dem Referenzstamm CBS138. Im oberen Teil wird der veränderte Ablauf und im unteren Teil die veränderte Zusammensetzung angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Ergosterolgehalt eine zentrale Rolle im Resistenzverhalten von *C. glabrata* gegen Amphotericin B spielt. Liegt ein Ergosterolanteil unter 1% vor, hat Amphotericin B keine Bindungspartner an der Zellmembran und kann seine Wirkung nicht entfalten.

4.3 Wirkmechanismus Amphotericin B: Schwammtheorie/Porentheorie

Der Wirkmechanismus von Amphotericin B ist nicht genau geklärt. Die jahrelang dominierende Theorie besagt, dass Amphotericin B hauptsächlich in Form von kleinen Ionenkanalaggregaten in die Lipiddoppelschicht eingefügt wird und dadurch die Hefezellen permeabilisieren und absterben. [24] Neuere Studien zeigen, dass die kanalbildende Fähigkeit von Amphotericin B für die fungizide Aktivität nicht erforderlich ist, während die Bindung von Ergosterol ausschlaggebend ist. [83] Im klassischen Kanalmodell liegt Amphotericin B hauptsächlich in Form von kleinen (ca. 1 nm) Ionenkanalaggregaten vor, die senkrecht zur Membranoberfläche in die Membran eingefügt sind, wobei Ergosterol-Moleküle zwischen Amphotericin B-Molekülen verzahnt sind. [24] In einem neuen Sterolschwammmodell existiert Amphotericin B hauptsächlich als große extramembranöser Aggregat, welches Ergosterol aus Lipiddoppelschichten extrahiert und somit den Zelltod herbeiführt. [84] In Zellkultur erzeugte Amphotericin B-resistente Mutanten haben im Allgemeinen modifizierte Sterole in ihren Membranen, an die Amphotericin B nicht binden kann. [85] So ist die Wirksamkeit von Amphotericin B stark abhängig vom Ergosterolgehalt der Zellmembran. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der Sterolanalyse von CG56 und CG22 und bedeutet, dass eine Amphotericin B-Resistenz maßgeblich vom Sterolgehalt der Zellmembran abhängig ist. So können Störungen des Sterolsynthesepaths aufgrund der vielen Intermediate nicht nur zu anderen Stoffwechselendprodukten führen oder direkt zum Zelltod führen, sondern auch eine Resistenz gegen Amphotericin B auslösen. Dies zeigt, dass der Sterolbiosyntheseweg ein guter Angriffspunkt für Antimykotika bleibt und vor allem der Sterolgehalt klinischer Isolate schnell Aufschluss auf den Therapieerfolg liefern könnte.

4.4 Target Alteration: Veränderungen der Angriffspunkte durch Mutationen oder Hochregulierungen der Zielgene

Sanglard et al. beschreiben in einem Review wie Veränderungen der Angriffspunkte durch Mutationen oder Hochregulation von Genen zu Resistenzmechanismen führen können. Eine große Anzahl an *ERG11* Mutationen wurde in Azol-resistenten *C.albicans* Stämmen nachgewiesen. Die Veränderung von *ERG11* (dem Angriffspunkt von Azolen) entweder durch Mutationen oder Steigerung der Genexpression wurde mehrfach dokumentiert. [81] Den Anteil jeder Mutation am Resistenzverhalten eines Isolates zu bestimmen ist dennoch sehr schwierig, da *ERG11* Mutationen häufig in Kombination auftreten und auch Resistenzmechanismen häufig in Kombinationen auftreten. [86] So wurde eine Hochregulation von *ERG11* in *C.albicans* auch häufig mit Azolresistenz assoziiert. [87, 88, 89] Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Mutation in *FKS2* das Echinocandinresistenzverhalten von CG56 erklärt. In der Literatur wird mehrfach belegt, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen *FKS1* oder *FKS2* Mutationen und Echinocandin-Resistenzen gibt. [90] Zusätzlich kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression der Gene *ERG2*, *ERG3* und *ERG6*, die gemeinsam mit den Ergebnissen der Sterolanalyse darlegen, dass der Sterolsyntheseweg in CG56 nicht dem normalen Wildtyp entsprechend ablaufen kann und es zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der Zellmembran gekommen ist. Dennoch reicht der Anteil des Ergosterols von 4% in den Zellmembranen offensichtlich aus, um eine Bindung von Amphotericin B sicherzustellen. Damit bleibt CG56 gegenüber dem Antimykotikum sensibel. Eine noch geringere Konzentration von Ergosterol scheint jedoch zur Resistenz gegen Amphotericin B beizutragen, wie man bei CG22 sehen kann. Die multiplen Resistenzen von CG22 deuten auf eine multifaktoriellen Erklärung als Ursache des massiven Resistenzverhaltens hin. Die Expression von *FKS2* zeigt sich für CG22 signifikant erhöht und liefert so einen Erklärungsansatz für die Echinocandin-Resistenz auch ohne Vorliegen einer *FKS1* oder *FKS2* Mutation. Durch die Hochregulation von *FKS* kann die Zellwandproduktion trotz der Anwesenheit von Echinocandinen fortgesetzt werden, was zu einer Resistenz gegen diese Antimykotika führen kann. [68, 91] Obwohl die *FKS*-Mutation der am weitesten verbreitete Mechanismus ist, ist die Medikamentenanpassung auch eine wichtige Zwischenstufe, die zur Echinocandin-

Resistenz führt [68]. Adaptive zelluläre Reaktionen sorgen dafür, dass die Zellen in Gegenwart des Medikaments überleben, was ihnen Zeit verschafft, den Wirkungen des Medikaments zu entkommen, indem sie *FKS*-Mutationen bilden. [92] Wang et al. beschreiben, dass die Hemmung der Glucansynthese durch Echinocandine Calcineurin-abhängige Stressreaktionen auslöst und die Aktivierung des Zellwandintegritätsweges zu einem Anstieg der *FKS2*-Expression führt. [93] Zusätzlich werden die *ERG*-Gene *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* und *ERG11* vermehrt exprimiert und lassen gemeinsam mit den Mutationen in *ERG3* und *ERG4* Rückschlüsse auf die Amphotericin B-Resistenz von CG22 zu. So deuten die Mutationen in *ERG3* und *ERG4* klar darauf hin, dass der Sterolsynthesepathway in diesem Stamm zur Bildung alternativer Sterole führt, was durch die Steroalanalyse auch bestätigt wurde. Eine Mutation allein in *ERG3* reicht für eine Amphotericin B-Resistenz aber noch nicht aus. Kannan et al. fanden bei Untersuchungen mit multiresistenten *C.lusitaniae* Isolaten heraus, dass die Amphotericin B-Resistenz zweier klinischer Isolate durch Mutationen in den Genen *ERG3*- und *ERG4*-ausgelöst wurde. Dies führte zu einem Funktionsverlust der *ERG*-Gene und somit wurde die Ergosterol-Biosynthese unterbrochen, was zu einer Anhäufung von Sterol-Vorläufern führte. Das Fehlen von Ergosterol in beiden Isolaten führte zu deren Amphotericin B Resistenz. Die Autoren fanden auch heraus, dass die Wiederherstellung von Wildtyp-Kopien von *ERG3* und *ERG4* in beiden Isolaten durch einen CRISPR-Cas9-Ansatz die Amphotericin B-Resistenz auf das Niveau des ursprünglichen Isolats zurückführte. Die Autoren betonen, dass die Amphotericin B-Resistenz bei Pilzpathogenen in der Regel durch Mutationen im Ergosterol-Biosyntheseweg verursacht wird und dass die Kombination von *ERG*-Mutationen bei Pilzpathogenen einzigartig ist. [94] Bemerkenswerterweise liegt diese Kombination aus Mutationen nun auch bei einem *C.glabrata* Isolat vor. Besonders interessant ist das klinische Isolat CG22 vor allem auch deswegen, weil weiterführende Stress-testungen zeigten, dass Amphotericin B keinen weiteren Einfluss auf das Wachstumsverhalten auslösen konnte und eine qualitativ hochwertige RNA Isolation möglich war, nachdem das Isolat zwei bzw. vier Stunden mit Amphotericin B inkubiert wurden, um eine ausführliche Transkriptionsanalyse durchführen zu können. Auch Versuche mit CG22 am Tiermodell könnten wichtige Antworten darauf geben ob eine *in vivo* Therapie mit Amphotericin B oder anderen Antimykotika zum Therapieversagen führen.

4.5 *ERG*-Gene im Zusammenhang zu Amphotericin B-Resistenz und Sterolzusammensetzung

Der Ausfall bestimmter *ERG*-Gene wird in der Literatur mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Pilze beschrieben. So zeigte die Systematische Deletion in *S.cerevisiae*, dass die Deletion der Gene *ERG7*, *ERG8*, *ERG9*, *ERG10*, *ERG11*, *ERG12*, *ERG19*, *ERG20*, *ERG25*, *ERG26* und *ERG27* lethale Auswirkungen auf die Pilze haben.[95] Vandepuut et al. konnten darstellen, dass es durch den Ausfall von *ERG6* und der damit verbundenen Inaktivierung der C24 Sterol Methyltransferase zum Abbruch des Ergosterolbiosynthesewegs führt und eine damit einhergehende Polyen-Resistenz beschrieben werden konnte. [80] Ahmad et al. untersuchten acht Amphotericin B-resistente *C. glabrata*-Stämme aus Kuwait und kamen zu dem Ergebnis, dass sechs Isolate eine Nonsense-Mutation in *ERG6* aufwiesen, während in zwei Isolaten eine *ERG2*-Mutation nachgewiesen werden konnten. Die anschließende Sterolanalyse mittels Gas-Chromatografie-Massen-Spektrometrie ergab einen folgerichtigen Mangel an Ergosterol.[96] Huprich beschreibt in ihrer Arbeit unter anderem auch mit dem klinischen Isolat CG22 des NRZMyk den Zusammenhang von Amphotericin B-Resistenz und Mutationen in *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* und *ERG11*. Hierbei kommt sie zu dem Ergebnis, dass eine alleinige Deletion von *ERG3* die Amphotericin B-Resistenz nicht reproduzieren kann.[97] Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass CG22 neben der Mutation Q26* in *ERG3*, die zu einem frühzeitigen Stopcodon und somit einer Dysfunktion in der Sterol-C5-Isomerase resultiert, auch eine Mutation in *ERG4* vorliegt. Hierbei handelt es sich um eine Loss-of-Function Mutation (*ERG4*.p.Thr158fs). Kannan et al. beschreiben das seltene Auftreten zweier *ERG* Mutationen in *Candida* Isolaten und liefern Beweise, dass die Mutationen in *ERG3* und *ERG4* gemeinsam zum fast kompletten Sterolverlust führen und daraus eine Amphotericin B-Resistenz in *C. lusitaniae* resultiert. [94] Interessanterweise senkt eine Mutation in *ERG3* den Ergosterolgehalt der Zellmembran bereits enorm, da dieser bei CG56 nur noch bei 4% liegt, anstatt bei 77% wie es beim Referenzstamm CBS138 der Fall ist. So führt die Loss-of-Function Mutation von *ERG3* (*ERG3*.p.Met1 Δ) in CG56 zu einer enormen Reduktion des Sterolanteils, wobei die MHK von Amphotericin B des CG56 bei 0,5 $\mu\text{g/ml}$ weiterhin auf einen Amphotericin B sensitiven Stamm hindeutet. So reicht

dieser Anteil an Sterol aus, dass Amphotericin B weiterhin wirksam ist und nur durch den kombinierten Ausfall von *ERG3* und *ERG4* und einem Reststerolanteil von 1,1% ist die Amphotericin B Wirkung inaktiviert. So lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Amphotericin B für eine suffiziente Wirkung an der Pilzzelle nur einen minimalen Anteil von Ergosterol benötigt, um seine Wirksamkeit entfalten zu können. Dies könnte auch eine Erklärung dafür liefern, wieso trotz der langen Verabreichungszeit seit den 1950er Jahren relativ wenige Amphotericin B-resistente *C. glabrata*-Stämme aufkommen. Der Sterolanteil von 1,1% bei CG22 reicht nicht mehr aus, dass Amphotericin B genug Bindungspartner an der Zellmembran finden kann, um die Pilzzelle anzugreifen.

4.6 Zusätzliche Stressmediatoren ohne Auswirkung auf Amphotericin B-resistente Stämme

C. glabrata hat sich erfolgreich adaptiert und ist in der Lage, menschliche mucosale Membranen zu kolonisieren und *in vivo* Veränderungen standzuhalten und zu überleben, auch unter antifungaler Therapie. [68] Healey et al. veröffentlichten 2018 ein Multistep-Modell für die Entstehung von Echinocandin-Resistenzen beginnend mit generellem Zellstress, Anpassung an Medikamente und Ausbildung von Toleranzen bis zur genetischen Veränderung (*FKS*-Mutationen). Die beiden MDR Stämme CG22 und CG56 zeigen in Stresstestungen kein auffälliges Verhalten. Einzig thermaler Stress in Form von Inkubation bei 42°C über 48h tolerieren die MDR-Stämme CG22 und CG56 besser als der sensitive Stamm CBS138. Selbst eine doppelte Stresszufuhr wie Myriocin zusätzlich zu Amphotericin B liefert keine auffälligen Ergebnisse. Auch eine Inkubation in Anwesenheit von Amphotericin B führte zu keiner Reaktionsänderung in CG22. Dies deutet daraufhin, dass eine Therapie mit Amphotericin B bei CG22 nicht nur un erfolgreich wäre, sondern auch, dass Amphotericin B keinerlei Einfluss auf das Verhalten von CG22 hat. In weiteren Transkriptionsanalysen soll genau beurteilt werden, welche Reaktion Amphotericin B an einem klinischen Isolat mit zu geringem Sterolanteil überhaupt auslösen kann.

4.7 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse bieten die Grundlage für weitere Forschungsprojekte. So bedarf es weiterhin einer genauen Analyse zur Klärung der Echinocandinresistenz von CG22 ohne *FKS*-HS-Mutation und einzig einer erhöhten Expression von *FKS2*. Desweiteren muss die These verifiziert werden, dass der Ausfall von *ERG3* und *ERG4* zu einer Amphotericin B-Resistenz führt. Die Wiederherstellung von Wildtyp-Kopien von *ERG3* und *ERG4* in CG22 und CG56 durch einen CRISPR-Cas9-Ansatz könnte die Amphotericin B-Resistenz auf das Niveau des ursprünglichen Isolats zurückführen. Zusätzlich sollten mittels Gendeletion und Transformation in den Referenzstamm CBS138 Mutanten erstellt werden, deren *ERG3* bzw. *ERG4* Gen deletiert wurden um zu verifizieren, dass dadurch eine Amphotericin B-Resistenz ausgelöst wird. Neben der Transkriptomanalyse der mit Amphotericin B vorbehandelten RNA von CG22 sollten auch weitere Versuche mit CG22 am Tiermodell durchgeführt werden, um weitere Rückschlüsse auf den *in vivo* Therapieerfolg von multiresistenten *C. glabrata*-Isolaten ziehen zu können.

4.8 Schlussfolgerung

Aus der vorliegenden Arbeit lassen sich anhand der eingangs vorgestellten Zielsetzung (1.6 Ziele dieser Arbeit) folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Eine Verifizierung des Resistenzverhaltens mithilfe von zehn Einzelkolonien scheint ausreichend, um eine Mischkultur ausschließen zu können. Die im Fokus der Arbeit stehenden klinischen Isolate CG22 und CG56 zeigten das bereits beschriebene Resistenzverhalten.

Durch die Genomsequenzierung konnten Mutationen auch außerhalb der *FKS1* und *FKS2* HS-Regionen identifiziert werden, die ursächlich für das Vorhandensein von Echinocandin-Resistenz sind.

Der Ergosterolgehalt der Zellmembran ist das Zentrum für die Entstehung von Amphotericin B-Resistenzen. So benötigt Amphotericin B keinen besonders hohen Sterolgehalt, um seine Wirksamkeit entfalten zu können, aber ab einem bestimmten Schwellenwert, welcher zwischen 1 und 4% liegt und der in weiteren Forschungen genau definiert werden muss, ist Amphotericin B wirkungslos.

Eine Mutation in *ERG3* ist nicht ausreichend, um eine Amphotericin B-Resistenz auszulösen, sondern nur die Kombination aus *ERG3* und *ERG4* führt zur seltenen Resistenz gegen Amphotericin B.

Die Genexpression klinischer *C. glabrata* Isolate gibt Rückschluss auf das Resistenz- und Stressverhalten des Pilzes und kann Hinweise auf potentielle Mutationen geben.

Ein Amphotericin B-resistenter *C. glabrata*-Stamm wird durch das Antimykotikum nicht weiter unter Stress gesetzt und auch weitere zusätzliche Stressmediatoren haben keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten. Hierbei soll das Transkriptom noch in weiteren Forschungen genau analysiert werden.

Während die Mechanismen der Azol-Resistenzen bereits weitestgehend geklärt sind, zeigt sich bei Echinocandin-Resistenzen und Amphotericin B-Resistenz, dass es sich um multifaktorielle Ereignisse handelt, die in diesem Rahmen nicht vollends aufgeklärt werden konnten.

5 Zusammenfassung

Die Zahl invasiver Pilzinfektionen ausgelöst durch *C. glabrata* steigt zunehmend und auch die Ausbildung multipler Resistenzen wird immer häufiger registriert.

In dieser Arbeit wurden zwei klinische MDR-*C. glabrata*-Stämme systematisch analysiert, um den Ursprung der Mehrfachresistenz zu finden. Aufgefallen waren jene Isolate in vorhergehenden Untersuchungen von Aldejohann et. al., die 176 Stämme, die dem Referenzzentrum NRZ-Myk zugesandt wurden, auf ihr Resistenzverhalten gegen Echinocandine analysierten und auf *FKS*-Mutationen untersuchten. Die Isolate CG22 und CG56 zeigten ein Resistenzverhalten gegen Anidulafungin ohne eine *FKS*-Mutation aufzuweisen. In Mehrfachtestungen wurde das einheitliche Verhalten von CG56 in zehn Einzelkolonien verifiziert, um Mischkulturen oder heterogenes Verhalten innerhalb des Isolates ausschließen zu können. Nach Analyse der gesamten Genomsequenz von CG56 zeigte sich eine Mutation kurz vor der HS-Region von *FKS2*, die eine Erklärung für das Resistenzverhalten zu liefern scheint. Neben der Mutation in *FKS2* wurde ebenfalls eine Mutation in *FKS1* und in *ERG3* bestätigt. Die Mutation in *ERG3* führt zu einer Verschiebung im Sterolsynthesepathway und zu einer Neuverteilung der Zellmembranbestandteile. Das klinische Isolat CG22 fällt mit Resistenzen gegen Azole, Echinocandine und Amphotericin B auf und zeigte ebenfalls eine Mutationen in *ERG3*. Zusätzlich dazu ergab sich eine Loss-of-Function-Mutation in *ERG4* und damit verbunden einen massiv reduzierten Ergosterolgehalt der Zellmembran. Die seltene Kombination aus *ERG3* und *ERG4* Mutation scheint die Erklärung für die außergewöhnliche Amphotericin B-Resistenz von CG22 zu liefern und wird hier als erstmals bei einem *C. glabrata* Isolat beschrieben. Dieser besondere Stamm, der sogar als panresistent bezeichnet werden kann, sollte Bestandteil weiterer Forschung werden.

Der Sterolsynthesepathway dient als Angriffspunkt vieler Antimykotika und kann durch seine vielen Intermediate und abweichenden Abläufen zu unterschiedlichen Stoffwechselendprodukten führen. Der Ergosterolgehalt der Zellmembran eines *C. glabrata*-Stammes kann weitere Rückschlüsse auf die Empfindlichkeit des Isolates geben und somit die Chancen des Therapieerfolges der Antimykotikagabe besser vorhersagen und könnte somit einen vielversprechenden Beitrag zur Behandlung lebensbedrohlicher Candidosen leisten.

Literatur

- [1] C. Lass-Flörl. „The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe“. In: *Mycoses* 52.3 (Mai 2009), S. 197–205.
- [2] F. Lamoth u. a. „Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis“. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 73.1 (Jan. 2018), S. 14–113.
- [3] J. C. O. Sardi u. a. „Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options“. In: *Journal of medical microbiology* 62.1 (Jan. 2013), S. 10–24.
- [4] M. A. Pfaller und D. J. Diekema. „Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem“. In: *Clinical microbiology reviews* 20.1 (Jan. 2007), S. 133–63.
- [5] D. L. Horn u. a. „Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48.12 (Juni 2009), S. 1695–703.
- [6] D. Bitar u. a. „Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010“. In: *Emerging infectious diseases* 20.7 (Juli 2014), S. 1149–1155.
- [7] M. von Lilienfeld-Toal u. a. „Invasive Fungal Infection“. In: *Deutsches Ärzteblatt international* 116.16 (Apr. 2019), S. 271–278.
- [8] C. J. Ingham u. a. „Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide“. In: *PLoS One* 7.3 (März 2012), S. 1–8.
- [9] V. Krcmery und A. J. Barnes. „Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance“. In: *Journal of Hospital Infection* 50.4 (Apr. 2002), S. 243–260.
- [10] X. Yang u. a. „Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study“. In: *The Lancet. Respiratory medicine* 8.5 (Mai 2020), S. 475–481.

-
- [11] G. Song, G. Liang und W. Liu. „Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China“. In: *Mycopathologia* 185.4 (Aug. 2020), S. 599–606.
- [12] T. Gabaldón, M. A. Naranjo-Ortíz und M. Marcet-Houben. „Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina“. In: *FEMS yeast research* 16.6 (Sep. 2016), S. 1564–1567.
- [13] A. Angoulvant, J. Guitard und C. Hennequin. „Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance“. In: *FEMS yeast research* 16.2 (März 2016), S. 114–123.
- [14] M. A. Pfaller u. a. „Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007“. In: *Journal of clinical microbiology* 47.10 (Okt. 2009), S. 3185–3190.
- [15] A. E. Barber u. a. „Comparative Genomics of Serial *Candida glabrata* Isolates and the Rapid Acquisition of Echinocandin Resistance during Therapy“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63.2 (Feb. 2019), S. 628–638.
- [16] J. W. Spatafora u. a. „The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies“. In: *Microbiology spectrum* 5.5 (Sep. 2017), S. 48109–48148.
- [17] H. W. Anderson. „Yeast-Like Fungi of the Human Intestinal Tract“. In: *The Journal of Infectious Diseases* 21.4 (Okt. 1917), S. 341–354.
- [18] M. H. Al-Yasiri u. a. „Opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* circulates between humans and yellow-legged gulls“. In: *Scientific reports* 6 (Okt. 2016), S. 36–57.
- [19] T. Gabaldón und C. Fairhead. „Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal“. In: *Current Genetics* 65.1 (Feb. 2019), S. 93–98.
- [20] K. R. Healey u. a. „Genetic Drivers of Multidrug Resistance in *Candida glabrata*“. In: *Frontiers in Microbiology* 7 (Dez. 2016).

-
- [21] B. D. Alexander u. a. „Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56.12 (Juni 2013), S. 1724–1732.
- [22] R. Sabra und R. A. Branch. „Amphotericin B nephrotoxicity“. In: *Drug safety* 5.5 (Feb. 1990), S. 94–108.
- [23] L. Ostrosky-Zeichner u. a. „Amphotericin B: time for a new "gold standard"“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37.3 (Aug. 2003), S. 415–425.
- [24] A. Lemke, A. F. Kiderlen und O. Kayser. „Amphotericin B“. In: *Applied microbiology and biotechnology* 68.2 (Aug. 2005), S. 151–162.
- [25] R. A. Zager. „Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content“. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 36.2 (Aug. 2000), S. 238–249.
- [26] M. F. Gonzalez-Lara, J. Sifuentes-Osornio und L. Ostrosky-Zeichner. „Drugs in Clinical Development for Fungal Infections“. In: *Drugs* 77.14 (Aug. 2017), S. 1505–1518.
- [27] G. P. Bodey. „Azole antifungal agents“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 14 Suppl 1 (März 1992), S. 161–169.
- [28] J.-F. Liu u. a. „Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast“. In: *World journal of microbiology & biotechnology* 35.7 (Juni 2019), S. 98.
- [29] C. F. Rodrigues, S. Silva und M. Henriques. „*Candida glabrata*: a review of its features and resistance“. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 33.5 (Mai 2014), S. 673–688.

-
- [30] R. A. Akins. „An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*“. In: *Medical mycology* 43.4 (Juni 2005), S. 285–318.
- [31] K. W. Henry, J. T. Nickels und T. D. Edlind. „Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44.10 (Okt. 2000), S. 2693–2700.
- [32] D. P. Kontoyiannis, N. Sagar und K. D. Hirschi. „Overexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43.11 (Nov. 1999), S. 2798–2800.
- [33] H. O. Khalifa u. a. „Genetic Basis of Azole and Echinocandin Resistance in Clinical *Candida glabrata* in Japan“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64.9 (Aug. 2020), S. 783–820.
- [34] J. Q.-M. Teo u. a. „Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates“. In: *BMC infectious diseases* 19.1 (Jan. 2019), S. 63.
- [35] B. G. Vu u. a. „The *Candida glabrata* Upc2A transcription factor is a global regulator of antifungal drug resistance pathways“. In: *PLoS genetics* 17.9 (Sep. 2021).
- [36] Q. Q. Li u. a. „Sterol uptake and sterol biosynthesis act coordinately to mediate antifungal resistance in *Candida glabrata* under azole and hypoxic stress“. In: *Molecular medicine reports* 17.5 (Mai 2018), S. 6585–6597.
- [37] M. K. Kathiravan u. a. „The biology and chemistry of antifungal agents: a review“. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 20.19 (Okt. 2012), S. 5678–5698.
- [38] P. G. Pappas u. a. „Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 62.4 (Feb. 2016), S. 1–50.
- [39] J. J. Torrado u. a. „Amphotericin B formulations and drug targeting“. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 97.7 (Juli 2008), S. 2405–2425.

-
- [40] A. C. Mesa-Arango, L. Scorzoni und O. Zaragoza. „It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug“. In: *Frontiers in microbiology* 3 (2012), S. 286.
- [41] J. C. Bowman u. a. „The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46.9 (Sep. 2002), S. 3001–3012.
- [42] X. Wang u. a. „Ste11p MEKK signals through HOG, mating, calcineurin and PKC pathways to regulate the FKS2 gene“. In: *BMC molecular biology* 12 (Nov. 2011), S. 51.
- [43] M. A. Pfaller. „Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment“. In: *The American journal of medicine* 125.1 Suppl (Jan. 2012), S. 3–13.
- [44] S. Katiyar, M. Pfaller und T. Edlind. „*Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50.8 (Aug. 2006), S. 2892–2894.
- [45] A. M. Aldejohann u. a. „Emergence of resistant *Candida glabrata* in Germany“. In: *JAC-antimicrobial resistance* 3.3 (Sep. 2021), S. 122.
- [46] D. S. Perlin. „Resistance to echinocandin-class antifungal drugs“. In: *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 10.3 (Juni 2007), S. 121–130.
- [47] M. A. Pfaller u. a. „Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria“. In: *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14.3 (Juni 2011), S. 164–176.
- [48] J. Turnidge und D. L. Paterson. „Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints“. In: *Clinical microbiology reviews* 20.3 (Juli 2007), S. 391–408.
- [49] K. Spettel u. a. „Do *Candida albicans* Isolates with Borderline Resistant Micafungin MICs Always Harbor FKS1 Hot Spot Mutations?“ In: *Journal of fungi* 7.2 (Jan. 2021), S. 93.

-
- [50] C. Müller u. a. „Antifungal drug testing by combining minimal inhibitory concentration testing with target identification by gas chromatography-mass spectrometry“. In: *Nature protocols* 12.5 (Mai 2017), S. 947–963.
- [51] S. Bhattacharya, B. D. Esquivel und T. C. White. „Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *mBio* 9.4 (Juli 2018), S. 29–38.
- [52] CLSI. „Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standards – Third Edition“. In: *CLSI document M27–A3* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).
- [53] M. A. Pfaller u. a. „Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp“. In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 79.2 (Juni 2014), S. 198–204.
- [54] R. M. Humphries, A. N. Abbott und J. A. Hindler. „Understanding and Addressing CLSI Breakpoint Revisions: a Primer for Clinical Laboratories“. In: *Journal of clinical microbiology* 57.6 (Juni 2019).
- [55] M. C. Arendrup u. a. „How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST)“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 26.11 (Nov. 2020), S. 1464–1472.
- [56] F. Morio u. a. „Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts“. In: *International journal of antimicrobial agents* 50.5 (Nov. 2017), S. 599–606.
- [57] T. R. Rogers u. a. „Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications“. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* (Juni 2022), S. 2053–2073.

-
- [58] T. Schwarzmüller u. a. „Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes“. In: *PLoS pathogens* 10.6 (Juni 2014), S. 42.
- [59] H. Yang u. a. „Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2“. In: *Nature communications* 6 (Feb. 2015), S. 6129.
- [60] R. Garcia-Rubio u. a. „Multifactorial Role of Mitochondria in Echinocandin Tolerance Revealed by Transcriptome Analysis of Drug-Tolerant Cells“. In: *mBio* 12.4 (Aug. 2021).
- [61] D. Kluepfel u. a. „Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum albomyces*“. In: *The Journal of antibiotics* 25.2 (Feb. 1972), S. 109–115.
- [62] R. C. Dickson und R. L. Lester. „Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1583.1 (Juni 2002), S. 13–25.
- [63] C. D. Pham u. a. „Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58.8 (Aug. 2014), S. 4690–4696.
- [64] A. T. Coste u. a. „Emerging echinocandin-resistant *Candida albicans* and *glabrata* in Switzerland“. In: *Infection* 48.5 (Okt. 2020), S. 761–766.
- [65] N. D. Beyda u. a. „FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 59.6 (Sep. 2014), S. 819–825.
- [66] M. Krogh-Madsen u. a. „Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient“. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42.7 (Apr. 2006), S. 938–944.
- [67] R. K. Shields u. a. „Spontaneous Mutational Frequency and FKS Mutation Rates Vary by Echinocandin Agent against *Candida glabrata*“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63.1 (Jan. 2019), S. 692–698.
- [68] K. R. Healey und D. S. Perlin. „Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*“. In: *Journal of fungi* 4.3 (Sep. 2018), S. 105.

-
- [69] S. D. Singh-Babak u. a. „Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*“. In: *PLoS pathogens* 8.5 (Mai 2012), S. 27–28.
- [70] M. Castanheira u. a. „Low Prevalence of fks1 Hot Spot 1 Mutations in a Worldwide Collection of *Candida* Strains“. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Aug. 2010), S. 2655–2659.
- [71] M. Castanheira u. a. „Frequency of fks mutations among *Candida glabrata* isolates from a 10-year global collection of bloodstream infection isolates“. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58.1 (Dez. 2014), S. 577–580.
- [72] G. R. Thompson 3rd u. a. „Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection“. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52.10 (Okt. 2008), S. 3783–3785.
- [73] M. Castanheira u. a. „Monitoring Antifungal Resistance in a Global Collection of Invasive Yeasts and Molds: Application of CLSI Epidemiological Cutoff Values and Whole-Genome Sequencing Analysis for Detection of Azole Resistance in *Candida albicans*“. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61.10 (Okt. 2017), S. 906–917.
- [74] C. F. Rodrigues und M. Henriques. „Portrait of Matrix Gene Expression in *Candida glabrata* Biofilms with Stress Induced by Different Drugs“. In: *Genes* 9.4 (Apr. 2018).
- [75] Q. Q. Li, J. Skinner und J. E. Bennett. „Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment“. In: *BMC molecular biology* 13 (Juni 2012), S. 22.
- [76] K. A. Morano, C. M. Grant und W. S. Moye-Rowley. „The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Genetics* 190.4 (Apr. 2012), S. 1157–1195.
- [77] M. Briones-Martin-Del-Campo u. a. „The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*“. In: *Revista iberoamericana de micologia* 31.1 (Jan. 2014), S. 67–71.

-
- [78] B. Enjalbert u. a. „Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*“. In: *Infection and immunity* 75.5 (Mai 2007), S. 2143–2151.
- [79] M. Cuéllar-Cruz u. a. „High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p“. In: *Eukaryotic cell* 7.5 (Mai 2008), S. 814–825.
- [80] P. Vandeputte u. a. „Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51.3 (März 2007), S. 982–990.
- [81] D. Sanglard, A. Coste und S. Ferrari. „Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation“. In: *FEMS yeast research* 9.7 (Okt. 2009), S. 1029–1050.
- [82] B. A. Skaggs u. a. „Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis“. In: *Gene* 169.1 (Feb. 1996), S. 105–109.
- [83] K. C. Gray u. a. „Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.7 (Feb. 2012), S. 2234–2239.
- [84] T. M. Anderson u. a. „Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge“. In: *Nature chemical biology* 10.5 (Mai 2014), S. 400–406.
- [85] D. S. Palacios u. a. „Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.17 (Apr. 2011), S. 6733–6738.

-
- [86] P. Marichal u. a. „Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*“. In: *Microbiology* 145 (Pt 10) (Okt. 1999), S. 2701–2713.
- [87] P. Marichal u. a. „Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41.10 (Okt. 1997), S. 2229–2237.
- [88] D. Sanglard u. a. „Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39.11 (Nov. 1995), S. 2378–2386.
- [89] S. Perea u. a. „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“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45.10 (Okt. 2001), S. 2676–2684.
- [90] K. R. Healey u. a. „*Candida glabrata* mutants demonstrating paradoxical reduced caspofungin susceptibility but increased micafungin susceptibility“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55.8 (Aug. 2011), S. 3947–3949.
- [91] R. Wang u. a. „Insights into specificity and catalytic mechanism of amphotericin B/ nystatin thioesterase“. In: *Proteins* 89.5 (Mai 2021), S. 558–568.
- [92] D. Farmakiotis, J. J. Tarrand und D. P. Kontoyiannis. „Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients“. In: *Emerging infectious diseases* 20.11 (Nov. 2014), S. 1833–1840.
- [93] Q. Wang u. a. „Two Sequential Clinical Isolates of *Candida glabrata* with Multidrug-Resistance to Posaconazole and Echinocandins“. In: *Antibiotics* 10.10 (Okt. 2021), S. 1217.
- [94] A. Kannan u. a. „Comparative Genomics for the Elucidation of Multidrug Resistance in *Candida lusitanae*“. In: *mBio* 10.6 (Dez. 2019), S. 2–9.
- [95] N. D. Lees u. a. „Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* –a review“. In: *Lipids* 30.3 (März 1995), S. 221–226.

- [96] S. Ahmad u. a. „ERG6 and ERG2 Are Major Targets Conferring Reduced Susceptibility to Amphotericin B in Clinical *Candida glabrata* Isolates in Kuwait“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63.2 (Feb. 2019), S. 900–908.
- [97] E. Huprich. „Functional analysis of amphotericin B-resistant clinical isolates of *Candida glabrata*“. Magisterarb. Julius-Maximilians-Universität Würzburg Fakultät für Biologie, 2021.

Anhang

I Abkürzungsverzeichnis

AMB, AP	Amphotericin B
AND	Anidulafungin
C.	<i>Candida</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSF	Caspofungin
DTT	Dithiothreitol
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG3	Sterol-C5-desaturase
ERG4	Sterol-C24-reduktase
ERG5	Sterol-C22-desaturase
Etest	Epsilometerest
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC-EI-MS	Gas-Chromatographie-EI-Massen-Spektrometrie
GRX	Glutaredoxin
HS	Hotspot
MCF	Micafungin
MDR	Multidrug-resistent
MHK	Minimale-Hemm-Konzentration
NRZMyk	Nationales Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen
NYS	Nystatin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RIN	RNA-Integritäts-Nummer
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-qPCR	Reverse Transkription gefolgt von quantitativer PCR
S.	<i>Saccharomyces</i>
SDG	Synthetic defined medium with Glucose
Sp.	Spezies
YPD	Yeast-Extract Pepton Dextrose

II Abbildungsverzeichnis

1	Zeitliche Darstellung der Neueinführungen von Antimykotika	4
2	Testung der klinischen <i>C. glabrata</i> -Isolate auf FKS-HS-Mutation in Kombination zu Anidulafunginresistenz.	10
3	Modifizierte Abbildung des Sterolsynthesewegs nach Müller et al.	12
4	Schematische Darstellung der Plattenbelegung der 96-Well Platte des Micronaut AM.	21
5	Beispielauswertung des Micronaut AM mit CG56	22
6	Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte des YeastOne	23
7	Beispielauswertung des YeastOne mit CG22	24
8	Beispiel Foto eines Anidulafungin-Etests (Biomerieux) des <i>C. glabrata</i> -Stamm CG56	25
9	Beispielhafte Darstellung eines Bioanalyser Assays des <i>C. glabrata</i> - Stamm CG22	27
10	Zusammenfassung der MHK-Werte der Micronaut und YeastOne Testungen der klinischen <i>C. glabrata</i> -Isolate CG22, CG56 und CBS138 mit entsprechenden Breakpoints gemäß EUCAST und CLSI	33
11	Abbildung der Epsilometertestungen mit Amphotericin B und Anidulafungin.	34
12	Wachstumsdarstellung von CG56 auf Chromagar	35
13	Zusammenfassung der Etests von zehn Einzelkolonien des CG56	36
14	Zusammenfassung der Micronautergebnissen von 10 Einzelkolonien des klinischen Isolats CG56 für AMB und AND	37
15	Zusammenfassung der Micronautergebnissen von 10 Einzelkolonien des klinischen Isolats CG56 in Doppeltestung für Caspofungin, Micafungin und 5-Fluorocytosin.	37
16	Zusammenfassung der Micronautergebnissen von 10 Einzelkolonien des klinischen Isolats CG56 in Doppeltestung	38
17	Beispielbild der <i>FKS2</i> Hotspot-PCR mit zehn Einzelkolonien des CG56	39
18	Beispielbild für ein Alignment von CG56 und zehn Einzelkolonien	40

19	Darstellung der vorhandenen Mutationen in CG22 und CG56 durch die Analyse des Broad Institutes.	41
20	Alignment <i>ERG3</i> von CBS138 mit CG22	42
21	Alignment <i>ERG4</i> von CBS138 mit CG22	43
22	Ergebnisse der Sterolanalyse für die Stämme CG22 +/- Amphotericin B, CG56 und CG78	45
23	Zusammenfassung der Prozentualen Sterolzusammensetzung	46
24	<i>FKS1</i> und <i>FKS2</i> Expression der <i>C. glabrata</i> Isolate CBS138, CG12, CG22, CG40, CG56 und CG173.	48
25	<i>ERG2</i> , <i>ERG3</i> , <i>ERG6</i> und <i>ERG11</i> Expression der <i>C. glabrata</i> Isolate CBS138, CG12, CG22, CG40, CG56 und CG173	50
26	Genexpression von <i>C. glabrata</i> -Mutante <i>upc2BΔ</i> im Vergleich zu CBS138	52
27	Expression von <i>FKS1</i> und <i>FKS2</i> in CG56 und CBS138 nach 1h und 4h Inkubation mit und ohne Anidulafungin.	54
28	Darstellung der Expression verschiedener Gene mit <i>RDN5.8</i> als Referenzgen für die Analyse der für 4h mit 0,03g/ml Anidulafungin vorbehandelten Kulturen CBS138 und CG56	56
29	Stresstestung: oxidativer Stress durch Menadion und ER Stress durch DTT auf YPD und SDG Agarplatten	59
30	Stresstestung: Thermaler Stress, Zellwandstress und osmotischer Stress auf YPD Agarplatten	60
31	Doppelstresstestung: CG22 mit Amphotericin B inkubiert und zusätzlichem ER Stress, Zellwandstress und oxidativem Stress	61
32	Doppelstresstestung: CG22 mit Amphotericin B inkubiert und zusätzlichem osmotischem Stress und thermalem Stress	62
33	Doppelstresstestung CBS138 mit Amphotericin B und 250 nM Myriocin	63
34	Doppelstresstestung der klinischen Isolate CG12,CG22,CG56 mit Amphotericin B und 250 nM Myriocin	63
35	Der Ablauf des Sterolsynthese Pathway bei Inaktivierung von <i>ERG3</i> und <i>ERG4</i> .	72

36 Vergleich der Sterolpathways der klinischen Isolate mit dem Referenzstamm

CBS138. 73

III Tabellenverzeichnis

1	Für diese Arbeit verwendete <i>C. glabrata</i> - Stämme.	15
2	Puffer, Medien und Lösungen	16
3	PCR Ansatz	17
4	PCR Programm	18
5	PCR Primer	19
6	Ansatz für RT-qPCR	28
7	RTq-PCR Programm	28
8	Primer RT-qPCR	29
9	Verwendete Stressmediatoren und die auslösende Stressart	31
10	Verwendete Chemikalien	
11	Verwendete Verbrauchsmaterialien	
12	Verwendete Geräte	

IV Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 10 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Sigma Aldrich
Q5® High Fidelity 2x Mastermix	New England Biolabs
Acid Phenol: Chloroform; pH 4,5	Thermo Fisher Scientific
Agarosepulver	Carl Roth
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Carl Roth
Amphotericin B	Selleckchem
Anidulafungin	Biomers
Aqua steril	B.Braun
AST-Indikator	Merlin
Calcofluor	Sigma Aldrich
Congored	Sigma Aldrich
DNA Ladder 50bp	New England Biolabs
E-Test Amphotericin B	Biomerieux
E-Test Anidulafungin	Biomerieux
Ethanol, > 99,9%	Hartenstein
Gel loading dye (6X)	New England Biolabs
Glass beads 2,85 - 3,45 mm (1kg)	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
Isopropanol, >99,9%	Carl Roth
Luna ® Universal One-Step RT-qPCR Kit	New England Biolabs
Menadion	Sigma Aldrich
Methanol, > 99,9%	Carl Roth
Methylenblau	Merlin
Micronaut-AM Antifunga Agents MIC	sifin diagnostics
Micronaut-RPMI-1640 + MOPS + Glucose	sifin diagnostics
Micronaut RPMI 1640 Medium	Merlin
Midori Green	Biozym
Myriocin	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
NucleoSpin Gel and PCR Clean up	Macherey – Nagel
Oligonucleotidprimer	Biomers
Pepton	Carl Roth
RNase A	Quiagen
RNase Away	Carl Roth
RNase ZAP	Sigma Aldrich
RPMI-Agar (MOPS-Glucose)	VWR
SDG	Agilent Technologies
SDS 20%	Carl Roth
TAE Puffer	Carl Roth
Wasser RNase frei	Gibco
YeastOne Bouillon + Platte	Thermo Fisher Scientific
YPD	VWR

Tabelle 11 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Mikrotitrierplatte Mx3000P	Agilent Technologies
Aluminiumfolie	Hartenstein
Biosphere Filter Tips 0,1-10 μ l	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 100-1000 μ l	Sarstedt
Biosphere Filter Tips 200 μ l ultralong	Sarstedt
Filtertips 0,5-20 μ l	Sarstedt
Filtertips 1000 μ l	Sarstedt
Filtertips 1250 μ l	Sarstedt
Filtertips 200 μ l (Länge: extralang)	Sarstedt
Handschuhe Peha-soft nitrile FINO	Hartmann
Impfösen 2,5mm Durchmesser	Hartenstein
Impfeschlinge 10 μ l , blau (à 10 Stk. verpackt)	Sarstedt
MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plates	Thermo Fisher
MicroAmp Optical Adhesive Film	ThermoFisher
Multiply-Pro Gefäß 0,2ml	Sarstedt
Parafilm „M“	Bemis
Pipettenspitzen 0,5-5ml in Box	Hartenstein
Pipettenspitzen 1000, 200, 10 μ l	Sarstedt
Pipettenspitzen 20-200 μ l	Gilson
Plattierungsspatel	Sarstedt
qPCR Adhesive Seal (Folien)	Biozym
Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel 1,5ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt
RNA Nano Chips	Agilent Technologies
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt
Tube 5ml	Sarstedt
Tubes 15ml, 50ml	Sarstedt
Tubes 50ml	greiner bio-one
Wattestäbchen	Heinz Herenz

Tabelle 12 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Abzug	Köttermann Systemlabor
Biometra Compact M Gelkammer	Biometra
Biometra Compact XS/S Gelkammer	Biometra
Biometra Standard Power Pack P25 T	Biometra
Brutschrank INCU-Line	VWR
Centrifuge 5424	Eppendorf
Centrifuge 5424R	Eppendorf
Combi-spin PCV-2400 Zentrifuge/Vortexmixer	VWR
Combi-Spin PVC-2400	Grant-Bio
Density Meter Ultraspect 10	Biochrom
Erlenmeyerkolben 25ml	VWR
Erlenmeyerkolben 50ml	VWR
Erlenmeyerkolben 100ml	VWR
Erlenmeyerkolben 1l	VWR
Gelkammer Compact M + Gel Casting System M	Analytik Jena
Gelkammer Compact S + Gel Casting System S	Analytik Jena
Gelkammer Kamm, 1,5mm 21 zählig für Kompakt M	Analytik Jena
Gefrierschrank	Liebherr
Handrückenzähler	Hartenstein
Kamera	Canon
Kühlblock Mini-Cooler	Hartenstein
Kühlschrank	Liebherr
Küvettenständer	Hartenstein
Labdancer	IKA
Laborgewindeflaschen 50ml, 100ml	Schott
Mehrkanalpipette	Brand
Messbecher aus PP 1000ml	Hartenstein
Messzylinder aus PP 100ml	Hartenstein
MyTemp Mini Digital Incubators	Benchmark Scientific
Mikroskop	VWR
Mikrowelle	Sharp
Nanodrop ONE	Thermo Scientific
Pipetman L P10L, 1-10 μ l , Metal Ejector	Gilson
Pipetman L Starter Kit, P20L, P200L, P1000L	Gilson
Pipetman L Starter Kit, P20L, P200L, P1000L	Gilson
Pipetman P10L, 1-10 μ l , Metal Ejector	Gilson

Fortsetzung auf nächster Seite

Tabelle 12 – Fortsetzung von vorheriger Seite

Bezeichnung	Hersteller
Pipettensatz	Gilson
Plate Fuge Microplate Microcentrifuge	Benchmark Scientific
Präzisionswaage PFB	Kern
qTower3 G Realtime Thermocycler	Analytik Jena
Reagenzröhrchen	Allgemeiner Vorrat
Rotana 460R Zentrifuge	Hettich Lab Technology
Secura Analysewaage	Sartorius
Schüttelgerät Vortex-Genie 2T EU	VWR
Schüttler "LabDancer"	VWR
Schüttelinkubator	Ecotron
Sicherheitswerkbank MaxiSafe2020	Thermo Scientific
Thermomixer C	Eppendorf
TProfessional Trio PCR Thermocycle	Analytik Jena
UVP eLITE Xenon	Analytik Jena
UVP Gelstudio PLUS	Analytik Jena
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries
Vortexer	VWR
Vortexer	IKA Works
Zählkammer Neubauer Improved	Hecht Assistent

V Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gebührt mein Dank meinem Betreuer Dr. Ronny Martin und der gesamten AG Kurzai, die mich nicht nur fachlich kompetent beraten haben, sondern mir auch immer wieder motivierende Worte und konstruktives Feedback mit auf den Weg gegeben haben.

Ich möchte mich bei meinen Eltern bedanken, die mich schon immer in meinem akademischen Werdegang unterstützt und ermutigt haben. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung und ihr Verständnis für meine zeitintensive Arbeit wäre ich nicht in der Lage gewesen, diese Dissertation fertigzustellen.

Die Stunden, die meine Familie darauf verwendet hat, meine Arbeit zu lesen, zu diskutieren und zu kritisieren, waren von unschätzbarem Wert.

Ich bin unendlich dankbar für die Unterstützung und Liebe, die mir von meinem Freund Julius und meiner Familie entgegengebracht wurden. Ohne sie wäre ich nicht in der Lage gewesen, diese Dissertation erfolgreich abzuschließen.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Freunde, die mich in dieser Zeit nicht nur moralisch unterstützt, sondern auch dafür gesorgt haben, dass ich immer wieder Ausgleich und Entspannung finden konnte.

Ohne die Unterstützung all dieser Menschen hätte ich diese Dissertation nicht vollenden können. Dafür bin ich von Herzen dankbar.