

# **Identifizierung und Charakterisierung neuer antimykotischer Substanzen gegen humanpathogene Pilze**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
Petra Doris Keller  
aus Stuttgart

Hauptberichter:	apl. Prof. Dr. Steffen Rupp
Mitberichter:	Prof. Dr. Roland Kontermann
Tag der mündlichen Prüfung:	01. August 2016

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der  
Universität Stuttgart

2016



*Meinen Eltern*

*Doris und Erwin Keller*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>15</b>
<b>Summary.....</b>	<b>19</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>23</b>
1.1 Humanpathogene Pilze – <i>Candida</i> spp. ....	23
1.2 Antimykotika und deren Wirkungsmechanismen .....	27
1.3 Resistenzmechanismen gegenüber Antimykotika in <i>C. albicans</i> .....	32
1.4 Die Ergosterol-Biosynthese .....	38
1.4.1 Das Enzym Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase .....	40
1.5 Neue antimykotische Wirkstoffe.....	40
1.6 Die neue antimykotische Substanz EMC120B12.....	43
1.7 Sterolanalytik .....	44
1.8 Zielsetzung .....	46
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.1 Chemikalien .....	47
2.2 Kit-Systeme, Enzyme und Antikörper .....	48
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	49
2.4 Geräte und Software.....	50
2.5 Verwendete <i>Candida</i> -Stämme und Wachstumsbedingungen.....	53
2.6 Anzucht von <i>Candida</i> -Stämmen .....	53
2.7 Kryokonservierung der verwendeten <i>Candida</i> -Stämme .....	53
2.8 Zellbiologische Methoden .....	53
2.8.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	54
2.8.2 Supplementierte Zellkulturmedien und Puffer.....	55
2.8.3 Kultivierung der verwendeten humanen Zelllinien .....	56
2.8.4 Kryokonservierung und Auftauen der Humanzellen .....	57
2.8.5 Invasionsassay in komplexen <i>in vitro</i> 3D-Hautmodellen.....	57
2.8.5.1 Aufbau der Kollagenmatrix und Aussaat der Humanzellen .....	59
2.8.5.2 Fixierung der 3D-Epithelmodelle und Einbettung in Paraffin.....	60
2.8.5.3 Herstellung der Paraffin-Blöcke .....	61
2.8.5.4 Schneiden der Paraffinblöcke mit dem Rotationsmikrotom.....	61
2.8.5.5 Entparaffinisierung und P.A.S. (periodic acid Schiff) - Färbung ...	61

2.9	Screening und Titration von Substanzen mit dem Activity-Selectivity-HTS Screening Assay (AS-HTS-Assay).....	63
2.9.1	Screening einer Substanzbibliothek mit dem AS-HTS-Assay.....	63
2.9.2	Titration von Hit-Substanzen mit dem AS-HTS-Assay und Bestimmung des IC <sub>50</sub> und CC <sub>50</sub> .....	65
2.10	Adaption des AS-HTS-Assays an weitere <i>Candida</i> spp.....	65
2.11	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von EMC120B12 und Fluconazol.....	66
2.12	Immunfluoreszenz von <i>C. albicans</i> Tubulin.....	67
2.13	Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> SC5314 mittels gesamtgenomischen DNA Microarrays.....	69
2.13.1	Inkubation mit Wirkstoff und Probenahme.....	69
2.13.2	RNA-Isolierung.....	69
2.13.3	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	70
2.13.4	Reverse Transkription und Labeling der Proben.....	70
2.13.5	Drucken und Blocken der DNA-Microarrays.....	70
2.13.6	Hybridisierung und Scannen der DNA-Microarrays.....	71
2.13.7	Datenanalyse der DNA-Microarrays.....	72
2.14	Sterolanalytik von <i>Candida</i> spp. mittels GC/MS.....	73
2.14.1	Kultivierung der Zellen: Inkubation der Testorganismen unter Zusatz antimykotischer Substanzen.....	74
2.14.2	Sterolextraktion.....	74
2.14.3	GC/MS-Messung.....	75
2.14.4	GC-Methode:.....	76
2.14.5	MS-Methode:.....	76
2.14.6	Auswertung der GC/MS-Daten.....	77
2.15	Optimierung der Auswertungsmethodik der GC/MS-Daten zur Sterolanalyse.....	78
2.16	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	81
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>85</b>
3.1	Identifizierung neuer antimykotischer Substanzen mit dem AS-HTS-Assay.....	85
3.1.1	Screening einer Substanzbibliothek mit dem AS-HTS-Assay.....	85
3.1.2	Rescreening auffälliger Einzelkomponenten aus dem AS-HTS-Screening.....	87
3.1.3	Titration von Substanzen mit dem AS-HTS-Assay und Bestimmung des IC <sub>50</sub> .....	88
3.2	Die neue antimykotische Substanz EMC120B12.....	89

---

3.3	Validierung des AS-HTS-Assays .....	90
3.3.1	Adaption des AS-HTS-Assays an weitere <i>Candida</i> spp. ....	90
3.3.2	Limitierung des AS-HTS-Assays .....	95
3.4	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von EMC120B12 und Fluconazol .....	96
3.4.1	MHK-Bestimmung mittels EUCAST für verschiedene <i>Candida</i> -Spezies .....	96
3.4.2	MHK-Bestimmung mittels EUCAST zur Selektion von Stämmen für die Sterol-Analytik .....	98
3.5	Die neue antimykotische Substanz EMC120B12 in komplexen Hautmodellen.....	101
3.6	Charakterisierung der Wirkungsweise und des Targets von EMC120B12.....	105
3.6.1	Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> mittels DNA Microarrays .....	106
3.6.2	Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit EMC120B12 .....	106
3.6.3	Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit Fluconazol .....	107
3.6.4	Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit Nocodazol.....	109
3.6.5	Zusammenfassung und Vergleich der Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen .....	109
3.7	Immunfluoreszenz von <i>C. albicans</i> Tubulin .....	112
3.8	GC/MS-Analysen der Sterolmuster von <i>Candida</i> spp. zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von EMC120B12.....	114
3.8.1	Stammauswahl für die Sterolanalytik.....	115
3.8.2	Optimierung der Auswertungsmethodik der GC/MS-Daten zur Sterolanalyse.....	116
3.8.3	Sterolanalysen von <i>C. albicans</i> und <i>C. krusei</i> mit optimierter Auswertung der Ergebnisse .....	118
3.8.3.1	Sterolanalysen von <i>C. albicans</i> und <i>C. krusei</i> mit Nocodazol zur Validierung der eingesetzten GC/MS-Methode .....	119
3.8.3.2	Sterolanalysen von <i>C. albicans</i> nach Behandlung mit Fluconazol und EMC120B12 zur Aufklärung des Wirkortes von EMC120B12 .....	120
3.8.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Sterolmuster von <i>C. albicans</i> .....	124

3.8.3.4	Sterolanalysen von <i>C. krusei</i> nach Behandlung mit antimykotischen Wirkstoffen zur Aufklärung des Wirkortes von EMC120B12.....	125
3.8.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der biochemischen Analyse der Sterolmuster von <i>C. krusei</i> .....	134
3.8.3.6	Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse der GC/MS-Analysen von <i>C. albicans</i> und <i>C. krusei</i> .....	135
3.9	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR.....	137
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>141</b>
4.1	AS-HTS-Screening-Assay .....	141
4.2	Die neue antimykotische Substanz EMC120B12.....	142
4.3	Charakterisierung der neuen antimykotischen Substanz EMC120B12.....	144
4.3.1	Transkriptionsanalysen von <i>C. albicans</i> .....	144
4.3.2	Immunfluoreszenz von <i>C. albicans</i> -Tubulin.....	147
4.3.3	EMC120B12 in komplexen <i>in vitro</i> Hautmodellen .....	147
4.3.4	MHK-Bestimmung mittels EUCAST im Vergleich zum AS-HTS-Assay.....	150
4.3.5	GC/MS-Analysen der Sterolmuster von <i>Candida</i> spp.....	151
4.3.5.1	GC/MS-Analysen der Sterolmuster von <i>C. albicans</i> .....	152
4.3.5.2	GC/MS-Analysen der Sterolmuster von <i>C. krusei</i> .....	156
4.3.6	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR zur Verifizierung des Targets.....	160
4.4	Zusammenfassung .....	162
4.5	Ausblick .....	164
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>167</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>177</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>179</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>195</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>197</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>199</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>203</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µl, l	Mikroliter, Liter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AmB, AmphoB	Amphotericin B
AS-HTS	Activity-Selectivity-High-Throughput-Screening
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic local alignment tool
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
ca.	circa
Can, C.	<i>Candida</i>
CC <sub>50</sub>	half cytotoxic concentration, mittlere zytotoxische Konzentration
cDNA	copy/complementary deoxyribonucleic acid
CDR	Candida Drug Efflux
Cfu	<i>Colony-forming unit (CFU)</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	Crossing Point
Cy	Cyanin
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast

DMEM	Dulbecco`s Modfied Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation (Electron Impact)
EMC120B12	(S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazol
ERG	Gen der Ergosterol-Biosynthese
Erg	Protein der Ergosterol-Biosynthese
Et al.	Et alii, und andere
Etc.	Et cetera
EtOH	Ethanol
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FCS	Fetal calf serum / Fötales (bovines) Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FLC	Fluconazol
F-UMP	5-Fluor-Uridin Monophosphat
Fwd/Rev	Forward/Reverse
g	Erdschwerebeschleunigung / Gravitationskonstante ( $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$ )
G	Guanin
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GC	Gaschromatographie
h	hour (Stunde)

---

HCl	Salzsäure
IC <sub>50</sub>	half inhibitory concentration, mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Immunfluoreszenz
LC	Light Cycler
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molar
M, mM, $\mu$ M	Molar, Millimolar, Mikromolar
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MDR	Multidrug Efflux
MF	Major faciliator
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mm, $\mu$ m, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massen-selektiver Detektor
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NaCl	Natriumchlorid
Noco	Nocodazol
nt	Nukleotide
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame
PBS	Phosphate buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction

PMT	Photomultiplier tube
PSA	Primary Secondary Amine, Primäres Sekundäres Amin
qPCR/qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR, quantitative Echtzeit-PCR
Rh	relative Luftfeuchtigkeit
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RRT	relative retention time, Relative Retentionszeit
RT	retention time, Retentionszeit
S1	Sicherheitsstufe 1 (Labor)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec.	Sekunde
SI	selectivity = $CC_{50} / IC_{50}$
spp.	species pluralis, mehrere Arten einer Gattung
SSC	Saline-Natriumcitrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBME	Tert.-Butylmethylether
TBS	Tris buffered saline
Tiff	Tagged Image File Format, Format zur Bildspeicherung
$T_m$	Melting point
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSMI	Trimethylsilylimidazol
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität

U	Uracil
ÜN	Über Nacht
WT	Wildtyp
YPD	Yeast extract Peptone-Dextrose



## Zusammenfassung

Pilzinfektionen stellen besonders in der Klinik ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar. Sie sind vor allem bei immunsupprimierten Patienten eine der Hauptursachen für deren Morbidität und hohen Sterberate. Patienten mit einem supprimierten Immunsystem können sehr anfällig für lebensbedrohliche systemische Infektionen durch humanpathogene Pilze sein. *Candida* Spezies, wie *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* und *Candida krusei* gehören zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen und sind die viert häufigste Ursache von nosokomialen Krankheiten. Diese Krankheiten reichen von weit verbreiteten oberflächigen Infektionen, wie einer vulvovaginalen Infektion, bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Candidosen. Vor allem gegen diese systemischen Mykosen steht jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Antimykotika zur Verfügung. Dabei handelt es sich um die am häufigsten verwendeten Klassen an antimykotischen Verbindungen wie die Azole, die Polyene und die Echinocandine. Antimykotika gegen Pilzinfektionen werden häufig präventiv in Kombination mit anderen Therapeutika gegeben. Diese präventive Gabe schädigt die symbiontische Flora und verursacht eine Selektierung von resistenten Stämmen. Die steigende Zahl an Pilzinfektionen und die Ausbildung von Resistenzen bei Standardtherapien, so wie erhebliche Nebenwirkungen und die hohen Kosten für einige Antimykotika führen zu einem Bedarf an neuen antimykotischen Wirkstoffen.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer antimykotischer Substanzen gegen humanpathogene Pilze. Dazu fokussierte sich diese Arbeit auf das Screening von Substanzen auf ihre antimykotische Wirkung und auf die Charakterisierung der Wirkungsmechanismen interessanter Verbindungen, um so das Arsenal an Verbindungen zu erweitern, die zu neuen Wirkstoffen weiterentwickelt werden können. Zur Identifizierung, Evaluierung und Optimierung neuer potenter Verbindungen mit einer weiten selektiven antimykotischen Aktivität wurde eine neue Art von Screening Assay verwendet: Der *in vitro* High-Throughput-Screening Activity-Selectivity Assay (AS-HTS-Assay). Dieser Assay imitiert die kleinste Einheit einer natürlichen Infektion. Wirtszellen werden dabei zusammen mit einem Pathogen, beispielsweise *Candida* spp., mit oder ohne eine antimikrobielle Substanz inkubiert. Alle potentiellen *in vitro* Ziele in der Zelle des Pathogens und der Wirtszellen können so gleichzeitig abgedeckt werden. Mit dieser neuen Art von Activity-Selectivity Assay

konnten in der vorliegenden Arbeit 3760 Substanzen gescreent werden. Insgesamt wurde mit dem Assay eine Substanz-Bibliothek mit 100,000 Verbindungen gleichzeitig sowohl auf deren antimykotische Aktivität als auch auf ihre Verträglichkeit für Humanzellen untersucht. Im gesamten Screening gab es einen vielversprechenden Hit, ein (S)-2-Aminoalkylbenzimidazol-Derivat. Dieses Derivat wurde EMC120B12 genannt und zeigt eine hohe antimykotische Aktivität gegen viele pathogene Hefen, einschließlich *C. glabrata* und *C. krusei*, welche auf viele Antimykotika unempfindlich reagieren. Auf einschichtigen Zellkulturen und in *in vitro* 3D-Gewebemodellen zeigte EMC120B12 eine gute Verträglichkeit auf Humanzellen und verursachte keinen zytotoxischen Effekt. Die *in vitro* 3D-Gewebemodelle wurden ebenso dazu verwendet Informationen über die Gewebegängigkeit, die Verträglichkeit und die Effizienz von EMC120B12 erhalten. Zudem konnte auch in diesen Modellen der antimykotische Effekt der Substanz nach einer Infektion mit *Candida* spp. gezeigt werden. Zur Charakterisierung und zur Identifizierung des Zielortes in der Pilzzelle wurden mittels Microarrays vergleichende Analysen der Transkriptionsprofile von EMC120B12 mit Fluconazol und Nocodazol durchgeführt. Die Ergebnisse für *C. albicans* zeigten, dass die neu entdeckte Verbindung ein Inhibitor des Ergosterol-Synthesewegs ist, wie dies für Azole, darunter Fluconazol, ebenfalls gezeigt wurde. Dies steht ganz im Gegensatz zu anderen Benzimidazol-Derivaten, wie Nocodazol, welche mit den Mikrotubuli und nicht im Ergosterol-Syntheseweg interagieren. Diese Unterschiede im Zielort zwischen dem Benzimidazol EMC120B12 und anderen Benzimidazolen konnten mittels Immunofluoreszenz-Aufnahmen bestätigt werden. Um das spezifische Zielenzym im Ergosterol-Biosyntheseweg zu identifizieren, wurden die Sterole verschiedener *Candida* spp. extrahiert und mittels GC/MS-Analysen analysiert. Die Daten zeigten, dass die Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (*ERG11*) im Ergosterol-Biosyntheseweg das Target von EMC120B12 darstellt, wie dies ebenfalls für Azole bekannt ist. Die Sterolmuster Fluconazol-resistenter Stämme ließen zudem deutlich Unterschiede nach einer Behandlung mit EMC120B12 im Vergleich zu Sterolmustern nach einer Fluconazol-Behandlung erkennen. Diese Ergebnisse stimmten mit den ermittelten MHK-Werten überein. Die MHKs für EMC120B12 waren niedriger. Trotz seiner intrinsischen Resistenz gegen Azole reagierte auch *C. krusei* sensitiv auf EMC120B12. Die Behandlung mit dieser Substanz zeigte einen starken Einfluss auf die Ergosterol Biosynthese, doch wurde für *C. krusei* nach der Behandlung ein anderes Sterolmuster als für *C. albicans* detektiert. Darüber hinaus traten in *C. krusei* nach Inkubation mit



EMC120B12 zwei neue Sterole auf. Diese beiden unbekanntes Sterole konnten als Derivate des Marker Sterols 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, das auf eine Erg11p Inhibition hinweist, identifiziert und zudem in den Syntheseweg von *C. krusei* eingeordnet werden. Interessanterweise konnten diese Sterole mit der 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -Diol-Struktur bei einer Fluconazol-Konzentration von >256  $\mu$ g/ml auch in *C. krusei* detektiert werden. *C. krusei* zeigt somit nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 256  $\mu$ g/ml Fluconazol ein vergleichbares Sterolmuster wie nach einer Behandlung mit 1  $\mu$ g/ml EMC120B12. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den ermittelten MHK-Werten für Fluconazol und EMC120B12 überein.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass sich der Wirkungsmechanismus von Fluconazol und EMC120B12 sehr ähneln, aber EMC120B12 viel effektiver als Fluconazol wirkt. Für denselben inhibitorischen Effekt ist eine viel geringere Menge EMC120B12 nötig. Zusätzlich zu der Identifizierung neuer bisher unbekannter Sterole konnte das erste Mal für eine Benzimidazol-Struktur gezeigt werden, dass diese die Ergosterol Biosynthese inhibiert. Das Benzimidazol-Derivat EMC120B12 ist daher eine vielversprechende neue antimykotische Substanz, die gegen die meisten pathogenen Hefen, auch gegen viele Azol-resistente Stämme, wirkt.



## Summary

Fungal infections are a significant health problem especially in clinics and they are a leading cause of morbidity and high mortality mainly in the immune-compromised patient. These patients with an impaired immune system can be highly susceptible to life-threatening systemic infections caused by fungal human pathogens. *Candida* species (such as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. krusei*) are some of the major fungal human pathogens and represent the fourth leading cause of nosocomial diseases. The disease ranges from widespread superficial infections like vulvovaginal infections to life-threatening systemic candidiasis. Especially for these systemic mycoses only a limited arsenal of antifungals is available, including the most commonly used classes of antifungal compounds like azoles, polyenes, and echinocandins. Antimycotics against fungal infections are frequently given preventively in combination with other therapeutics. This regimen, however, also affects the commensal flora and ends in a selection of resistant strains. The increasing number of fungal infections and the development of resistance to standard therapies as well as the significant side effects and high costs for several antifungals result in a need for new antifungals.

The aim of this work is the identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal human pathogens. Therefore, this thesis focused on screening substances for their antimycotic activity and on characterising the mechanism of action of interesting compounds in order to expand the arsenal of compounds, which are applicable to enhance them as new antimycotics. For the identification, evaluation and optimization of new potent compounds with broad selective antifungal activity we used a new kind of screening assay: The *in vitro* high-Throughput-Screening Activity-Selectivity Assay (AS-HTS-Assay). This assay mimics the smallest unit of a natural infection by incubating host cells with the pathogen, e.g. *Candida* species, in the presence or absence of antimicrobial compounds. All potential *in vitro* targets of the pathogen and the host cells can be covered simultaneously. With this new type of activity-selectivity assay 3760 substances could be screened in this work. In total a compound library of 100,000 heterocyclic substances were analyzing for both the antifungal activity and the compatibility with human cells at the same time. One promising hit of the screening, an (S)-2-aminoalkyl benzimidazole derivative, was called EMC120B12 and has a high antifungal activity against several species of pathogenic yeasts, including *C. glabrata* and *C. krusei*, which are highly refractory to

many antifungals. On cell-monolayers and in *in vitro* 3D tissue models EMC120B12 showed a good compatibility with human cells and had no cytotoxic effect. The *in vitro* 3D tissue models were also used to provide information about tissue penetration, tolerability and efficiency of EMC120B12. Furthermore, the antimycotic effect of the compound after infection with *Candida* spp. could also be shown in these *in vitro* models.

For characterisation and target identification comparative analyses of EMC120B12 with fluconazole and nocodazole, using transcriptional profiling via microarrays were performed. The results of transcriptional profiling of *Candida albicans* revealed that the newly discovered compound is an inhibitor of the ergosterol pathway, as it is also shown for azoles such as fluconazole. This is in contrast to other benzimidazole-derivatives like nocodazole, which target microtubules and not the ergosterol pathway. These differences concerning the target between the benzimidazole EMC120B12 and other benzimidazoles are verified via immunofluorescence microscopy.

To further verify the specific target enzyme in the ergosterol pathway, sterols of different *Candida* spp. were extracted and GC/MS analyses were carried out. The data strongly suggest that the lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (*ERG11*) in the ergosterol pathway is the target for EMC120B12 as it is known for azoles. Besides, sterol patterns of fluconazole resistant strains revealed differences after EMC120B12 treatment compared to sterol patterns after fluconazole treatment. These results match with the determined MICs, which are lower for EMC120B12.

Despite of its intrinsic resistance against azoles, *Candida krusei* is also sensitive to EMC120B12. The EMC120B12 treatment shows a strong impact on ergosterol synthesis, but a different sterol pattern for *C. krusei* as it is observed for *C. albicans*.

Furthermore, two novel sterols in *C. krusei* appeared after incubation with EMC120B12. These two unknown sterols could be identified as derivatives of the marker sterol 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, which indicate a Erg11p inhibition, and could be integrated in the pathway of *C. krusei*. Interestingly at fluconazole concentrations >256  $\mu$ g/ml these novel sterols with a 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structure could also be detected in *C. krusei*. Thus, *C. krusei* shows a very similar sterol pattern for 256  $\mu$ g/ml fluconazole and for 1  $\mu$ g/ml EMC120B12. These results do also match with the determined MICs for fluconazole and for EMC120B12.

All the results of this thesis show that there is a high similarity between the mode of action of fluconazole and EMC120B12, but EMC120B12 is much more effective than fluconazole. It is much less EMC120B12 needed to observe the same effect. In addition to the identification of novel sterols, this is the first time that a benzimidazole structure has been shown to result in an inhibition of the ergosterol pathway. Hence, the benzimidazole derivative EMC120B12 is a promising new antifungal substance acting on most pathogenic yeasts, likewise on many strains, that show a resistance against azoles.



# 1 Einleitung

## 1.1 Humanpathogene Pilze – *Candida* spp.

Pilze kommen in der Natur in großer biologischer Vielfalt vor. Es gibt mehr als eine Million verschiedene Arten, die aufgrund Morphologie und der geschlechtlichen Vermehrungsformen unterschieden werden. So können die *Eumyceten* („echte Pilze“) in niedere Pilze wie die *Zygomyceten* und *Chytridiomyceten* in höhere Pilze wie die *Ascomyceten* oder die *Basidiomyceten* eingeteilt werden (Hibbett et al., 2007; Hof, 2003). Die Gattung *Candida* gehört zum Stamm der *Ascomyceten* (Schlauchpilze) und der Ordnung der Saccharomycetales. *Candida albicans* ist ein Hefepilz mit diploidem Genom bestehend aus acht Chromosomenpaaren, der sich asexuell vermehrt (Hull et al., 2000; Magee und Magee, 2000; Pujol et al., 1993). Dieser polymorphe Pilz kommt in verschiedenen Wachstumsformen vor und kann morphogenetisch reversibel zwischen einzelligen Blastosporen (Hefeform), mehrzellige Pseudohyphen, Chlamydosporen oder Hyphen wechseln (Odds, 1988; Calderone und Fonzi, 2001; Gow et al., 2002).

Die Proliferation der Blastosporen, die einen Durchmesser von 4-6 µm haben, erfolgt durch Sprossung. Pseudohyphen entstehen durch unipolares Wachstum, bei dem sich Mutter- und Tochterzelle nicht mehr voneinander trennen und somit jede Zelle des Filaments durch Sprossung aus der Zelle zuvor hervorgeht. Da sich die Zellen nicht mehr trennen, entstehen so Ketten einzelner Zellen (Lo et al., 1997).

Durch kontinuierliches apikales Wachstum einzelner Blastosporen können sich Hyphen ausbilden. Diese langen, röhrenförmigen Filamente sind durch Septen segmentiert, welche einzelne mononukleare Zellen voneinander trennen. Die Fähigkeit morphogenetisch zwischen einzelliger Hefezelle und filamentösen Wachstumsformen zu wechseln wird als Dimorphismus bezeichnet (Abbildung 1). Unter allen *Candida*-Spezies zeigen insbesondere *C. albicans* und *Candida dubliniensis* beide Formen des filamentösen Wachstums (Odds und Bernaerts, 1994; Calderone und Fonzi, 2001).

*C. albicans* ist als opportunistischer, kommensaler Organismus hauptsächlich auf Haut und mukosalen Epithelien überwiegend des urogenitalen und gastrointestinalen Traktes zu finden. Nahezu 70 % der gesunden menschlichen Bevölkerung trägt diesen Pilz als Kommensal und bei einem funktionsfähigen Immunsystem des Wirtes

verursacht er in der Regel keinen Schaden (Hube, 2004; Calderone, 2002; Odds und Bornaerts, 1994). *C. albicans* ist aber auch ein fakultatives Pathogen. Durch ein Ungleichgewicht, beispielweise durch Störung der Mikroflora oder des Immunsystems kann, der Pilz zum Pathogen werden und Infektionen verursachen. *C. albicans* besitzt die Fähigkeit als Kommensal auf anatomisch sehr unterschiedlichen Bereichen mit den verschiedensten Umweltbedingungen zu überleben. Dadurch übersteigt das durch *Candida* spp. verursachte Krankheitsspektrum, das der meisten anderen kommensalen Mikroorganismen (Calderone und Fonzi, 2001, Sohn et al., 2006).

Durch *Candida* spp. induzierte Mykosen, die sogenannten Candidosen, können durch verschiedene immunschwächende Ursachen hervorgerufen werden. So zählen unter anderem Neutropenie, Chemotherapie, Dialyse, virale Infekte oder Langzeitbehandlungen mit Antibiotika aber auch Transplantationen und chirurgische Eingriffe, sowie intravenöse Katheter und künstliche Ernährung neben Traumata und Verbrennungen und sehr hohes Alter zu Faktoren für Candidosen (Odds, 1988; Mavor et al., 2005; Kaufmann, 2006; Samaranayake und Samaranayake, 1994; Pfaller und Diekema 2007).

Das Spektrum der *Candida*-Infektionen reicht von oberflächlichen Mykosen der Haut und Schleimhäute bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen verschiedenster Organe wie Nieren, Milz, Leber, Herz oder Gehirn bei immunsupprimierten Patienten. Die Invasion und Ausbreitung von *Candida* spp. über den Blutstrom ist dabei vom Immunstatus des Patienten abhängig. Das zunehmende Auftreten von invasiven Pilzinfektionen ist ein Ergebnis vieler Faktoren, zu welchen insbesondere der Anstieg von Patienten mit starker Immunsuppression in Krankenhäusern zählt. Immunschwache Patienten sind anfälliger für schwere Infektionen was erklärt, weshalb schwere Candidosen in Krankenhäusern immer häufiger beobachtet werden (Loeffler und Stevens, 2003, de Pauw und Meunier, 1999; Berman und Sudbery, 2002, Sohn et al., 2006). *Candida* Spezies gelten mittlerweile als vierthäufigste Erreger für nosokomiale Blutbahninfektionen. Auf Intensivstationen belegen die *Candida*-Spezies sogar Platz drei. Hier treten schätzungsweise 30-50 % aller invasiven Candidosen auf. Bei immunschwachen Patienten sind Candidosen die häufigsten lebensbedrohlichen Pilzinfektion, die mit einem langen Krankenhausaufenthalt verbunden sind und hohe Kosten mit sich bringen (Pfaller und Diekema, 2007; Tortorano et al., 2006).

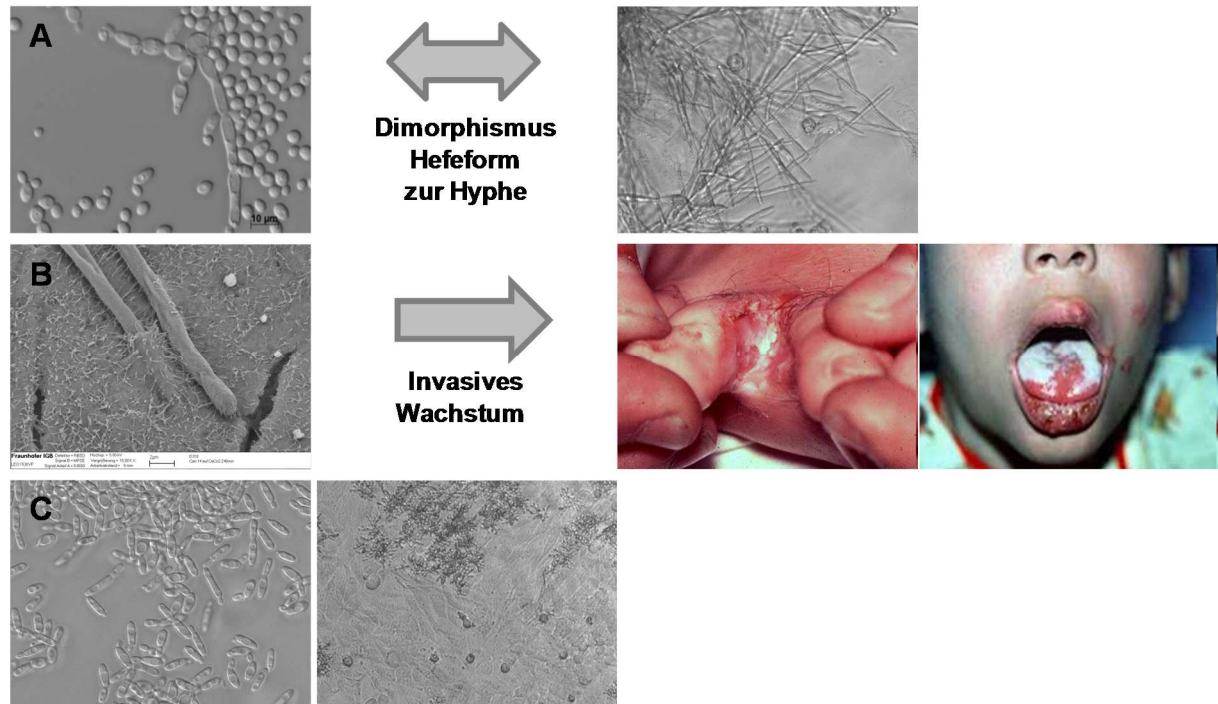


Dabei liegt die Mortalitätsrate bei Patienten für systemische Mykosen bei 46-75 % (Pfaller und Diekema, 2007; Hof, 2003). Diese hohe Zahl ist momentan trotz großer Fortschritte der antimykotischen Therapie unverändert. Dies alles stellt die Bedeutung von *Candida* spp. als Krankheitserreger nochmals besonders heraus (Kanafani und Perfect, 2008; Pfaller und Diekema, 2007; Tortorano et al., 2006; Kaufmann, 2006; Calderone und Fonzi, 2001; Maschmeyer et al., 2009).

Mehr als 17 Spezies des fakultativen Pathogen *Candida* gelten als humanpathogen. Mehr als 90 % der invasiven Infektionen werden allerdings nur fünf Spezies zugeschrieben - *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, und *Candida krusei*. Darunter ist *C. albicans* die am häufigsten vorkommende Spezies und mehr als die Hälfte der Candidosen in Patienten werden durch diesen Pilz verursacht. Dennoch zeigen Daten eine Verlagerung von *C. albicans* zu Nicht-albicans-Spezies wie *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, und *C. krusei*. Es ist eine drastische Zunahme an Infektionen durch diese Spezies zu verzeichnen. Dabei sind *C. glabrata* und *C. tropicalis* von großer klinischer Bedeutung, aber auch *C. parapsilosis* und *C. krusei*-Infektionen nehmen aktuell immer mehr zu (Fidel et al., 1999; Kaufmann, 2006; Tortorano et al., 2006; Fisher et al. 1989; Marichal et al., 1999). *C. krusei* spielt dabei eine immer größere Rolle und wird vor allem bei Patienten mit akuter Leukämie diagnostiziert (Abbas et al., 2000).

Im Gegensatz zu den meisten anderen *Candida* spp., deren Zellen eiförmig sind, ist *C. krusei* im Allgemeinen gestreckt und eher zylindrisch. Die Blastosporen sind meist 2,2-5,6 x 4,3-5,2 µm groß und zeigen eine große Variation in Länge und Breite. Im Vergleich zu anderen *Candida* spp. unterscheidet sich *C. krusei* in seinem Metabolismus und in seinem Verhalten gegenüber der Wirtsabwehr. Zudem haben die Zellen einen anderen strukturellen Aufbau. Die mehrschichtige Zellwand besteht aus sechs Schichten und intrazytoplasmatischen Organellen. Die Unterschiede in Größe und dem Aufbau der Zellwand lassen auf eine unterschiedliche Interaktion von *C. albicans* und *C. krusei* mit Neutrophilen schließen. Neutrophile allein können *C. krusei* nicht effektiv kontrollieren. Zudem wird weniger Phagozytose von *C. krusei* beobachtet als dies für *C. albicans* bekannt ist und die Adhäsion an epitheliale Oberflächen im Wirt ist geringer. *C. krusei* ist in zwei morphologischen Formen zu finden, welche zeitgleich auftreten können. So kommt der Pilz in der Hefeform vor, kann aber auch Pseudohyphen ausbilden. Meist geht einer *C. krusei* Infektion eine Infektion mit einer anderen *Candida*-Spezies wie *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*

oder *C. parapsilosis* voraus (Richardson und Donaldson, 1994; Samaranayake und Samaranayake, 1994).



**Abbildung 1: Verschiedene Wachstumsformen von *C. albicans* und *C. krusei***

**A** *C. albicans* in einzelliger Hefeform und nach morphogenetischem Wechsel in die filamentöse Wachstumsform.

**B** Aufnahme des filamentösen Wachstums von *C. albicans* mit dem Elektronen-Mikroskop. Die Hyphe dringt in die Wirtszelle Caco-2 ein (links). Unterschiedliche Formen von *Candida*-Infektionen auf Haut- und Schleimhaut ((rechts) Quelle: overcomingcandida.com; botit.botany.wisc.edu).

**C** *C. krusei*-Zellen bei Wachstum unter verschiedenen Bedingungen. Die einzellige Hefeform ist in YPD, 30 °C (links, Vergrößerung 40x) aber auch unter hyphen-induzierenden Bedingungen im AS-HTS-Assay, Wachstum hierbei auf Humanzellen in RPMI, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (rechts, Vergrößerung 20x) zu sehen.

In vergleichenden *in vitro* Studien konnten für *C. krusei*, aber auch für *C. glabrata*, deutlich höhere Fluconazol-MHK-Werte als für die meisten *C. albicans*-Isolate gezeigt werden. *C. krusei* besitzt somit eine intrinsische Resistenz gegen Fluconazol (Odds, 1993; Burger-Kentischer et al., 2010; Messer et al., 2006).

Die Zunahme von HIV-Infektionen und der Anstieg von immunsupprimierten Patienten lässt deshalb ein Reservoir für *C. krusei* entstehen. Durch die Langzeittherapie mit Fluconazol, um Pilzinfektionen in AIDS-Patienten zu unterdrücken, aber auch durch die prophylaktische Anwendung des Triazols bei Chemotherapie-Patienten, kommt es in Verbindung mit der intrinsischen Resistenz von *C. krusei* zu einem signifikanten Anstieg von Infektionen bis hin zu Superinfektionen (Samaranayake und Samaranayake, 1994; Pfaller et al, 2008; Pfaller und Diekema, 2007; Orozco et al,

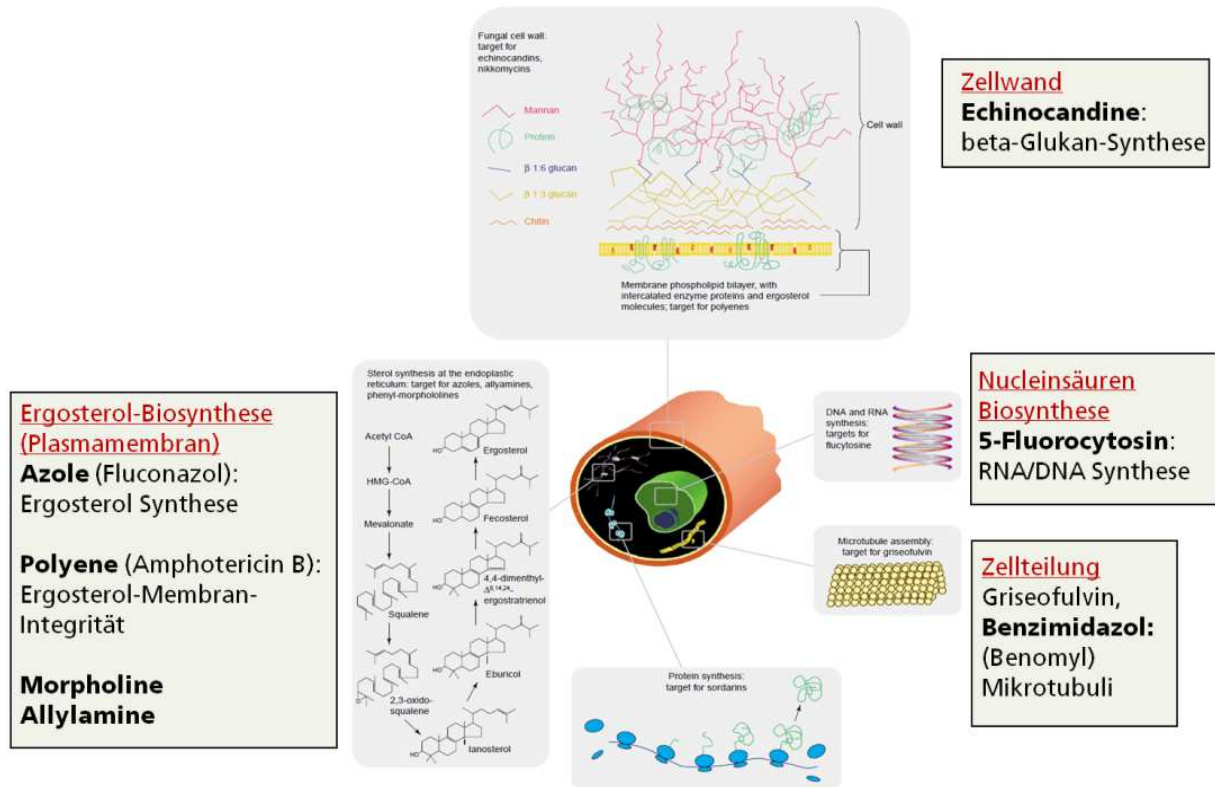
1998; Sanglard und Odds, 2002; Anaissie et al., 1993; Odds, 1993; Abbas et al., 2000; Vanden Bossche et al., 1994).

Pilzinfektionen stellen folglich ein ernstzunehmendes Problem in Kliniken dar. Es steht zwar eine limitierte Anzahl an Antimykotika zur Verfügung, um gegen *Candida*-Infektionen vorzugehen, doch insbesondere gegen *C. krusei* ist die Auswahl an Wirkstoffen aufgrund der intrinsischen Resistenz des Pilzes stark limitiert (Pfaller und Diekema, 2007; Kanafani und Perfect 2008). Zudem nehmen die Entwicklung von Wirkstoff-Resistenzen sowie resistente Isolate in Patienten unter Langzeittherapie immer weiter zu (Loeffler und Stevens, 2003; Sanglard, 1996; Sanglard und Odds, 2002).

Insbesondere die prophylatische Gabe von Fluconazol, vor allem in niedrigen Konzentrationen bei rezidivierenden Candidosen und periodische Therapien begünstigt die Entwicklung von resistenten Stämmen. Daher ist keine Substanzklasse der Antimykotika bei dieser Entwicklung ausgenommen (Pfaller et al., 2001; Pfaller und Diekema, 2007; Vanden Bossche et al., 1994; Samaranayake und Samaranayake, 1994).

## **1.2 Antimykotika und deren Wirkungsmechanismen**

Wie bereits beschrieben stehen zur Behandlung von Candidosen einige Antimykotika aus verschiedenen Substanzklassen zur Verfügung. Diese besitzen unterschiedliche Angriffspunkte im Pilz, wie dies in Abbildung 2 dargestellt ist. Die drei Haupt-Substanzklassen, Azole, Polyene und Allyamine verdanken ihre antimykotische Aktivität der Hemmung der Synthese von Ergosterol (siehe Abbildung 3) oder der direkten Interaktion mit dieser Hauptkomponente der pilzlichen Zellmembran. Zudem interagieren Morpholine mit der Ergosterol-Biosynthese (Ghannoum und Rice, 1999).



**Abbildung 2: Verschiedene Substanzklassen der Antimykotika mit deren Angriffspunkten in der Pilzzelle, modifiziert nach Odds et al., 2003**

**Polyene** (zum Beispiel Amphotericin-B-Desoxycholat und seine Lipid-assoziierten Formulierungen) interagieren mit Ergosterol in der Zellmembran des Pilzes. Amphotericin B bildet einen Komplex mit Ergosterol. Dadurch entstehen Poren und die Permeabilität in der Membran wird erhöht. Dies führt zum Ausströmen von Kationen, zur Störung des Zellmembranpotentials, zu beeinträchtigten Zellfunktionen und letztendlich zum Tod der Zelle. Aufgrund von bekannter Toxizität wird Amphotericin B vorwiegend für kurze Behandlungen eingesetzt. Das menschliche Cholesterol ist dem Ergosterol sehr ähnlich, doch die Substanz besitzt eine wesentlich höhere Affinität gegenüber der pilzlichen Membrankomponente (Loeffler und Stevens, 2003; Akins, 2005; Lupetti et al., 2002; Ghannoum und Rice, 1999; Kanafani und Perfect, 2008).

Auch **Allylamine** greifen in die Ergosterol-Biosynthese ein. Sie inhibieren die Squalenepoxidase, welche Squalen in Squalenepoxid überführt. Eine Hemmung dieses Enzyms verhindert die Ergosterolbildung und führt zudem zu einer Anreicherung von toxischem Squalen. Somit haben Allylamine, wie Naftitin und Terbinafin, neben der fungistatischen auch eine fungizide Wirkung, welche durch das toxische Produkt verursacht wird. Allylamine haben kein so breites Wirkungsspektrum wie Azole, wirken jedoch selektiver gegen Pilze, da die Squalenepoxidase von

Säugern erst in deutlich höheren Konzentrationen gehemmt wird. Verwendet werden Allylamine für oberflächliche Infektionen der Haut beispielsweise bei *Tinea pedis* und systemischen Infektionen (Bracher, 2003; Odds et al, 2003; Lupetti et al., 2002).

**Morpholine** interagieren ebenfalls in der Ergosterol-Biosynthese. Ihr Vorteil ist, dass sie zwei verschiedene Enzyme hemmen, die C14-Reduktase und die  $\Delta 7\Delta 8$ -Isomerase. Durch einen synergistischen Effekt der Hemmung an zwei Stellen kommt es zu einem deutlich geringeren Resistenzrisiko. Die Bildung von Ergosterol wird verhindert und eine fungistatische Wirkung erzielt. Amorolfin ist derzeit der einzige Vertreter der Morpholine in der Humantherapie und wird bei Onychomykosen eingesetzt. Im Pflanzenschutz und in der Tiermedizin finden auch andere Vertreter der Substanzklasse, wie Tridemorph und Phenpropimorph, Verwendung (Müller et al. 2013; Bracher, 2003; Lupetti et al., 2002).

Sehr lange war Amphotericin B das Mittel der Wahl für die Behandlung von systemischen Mykosen. Aufgrund seiner Nephro-Toxizität, wurde das Polyene jedoch durch die **Azole** abgelöst. Diese Substanzklasse, darunter insbesondere Fluconazol, Ketoconazol, Posaconazol und Itraconazol, stellt heute die gängigste Behandlung von *Candida*-Infektionen und verschiedenster Arten von oberflächlichen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Pilzinfektionen dar. Zur Prophylaxe ist Fluconazol das Mittel der Wahl. Fluconazol hat sehr gute chemische Eigenschaften, wie gute Löslichkeit in Wasser und eine schwache Protein-Bindung, und es wird nach oraler Aufnahme gut absorbiert (Samaranayake und Samaranayake, 1994).

Azole sind gegen die C14-Demethylase (ein Cytochrom P450 Enzym) in der Ergosterol-Biosynthese gerichtet. Dies ist ein Schlüsselenzym im Ergosterol-Syntheseweg. Die Hemmung resultiert in einer Abreicherung von Ergosterol und einer Akkumulation von 14-Methylsterolen, welche die Funktion von Ergosterol als Hauptkomponente der Zellmembran stören (Lupetti et al., 2002). Azole wirken fungistatisch und besitzen deutlich weniger Nebenwirkungen als Polyene. Sie werden bei lokalen und systemischen Infektionen eingesetzt. Die prophylaktische Gabe führt jedoch zunehmend zu Resistenzen in klinischen *Candida*-Isolaten (Bracher, 2003; Müller et al., 2013; Morschhäuser, 2003).

Die Zellwand des Pilzes stellt ebenfalls einen idealen Angriffspunkt für Antimykotika dar. Sie ist aus Chitin und Polysacchariden aufgebaut, die in dieser Form im Menschen nicht vorkommen. **Echinocandine**, wie Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin

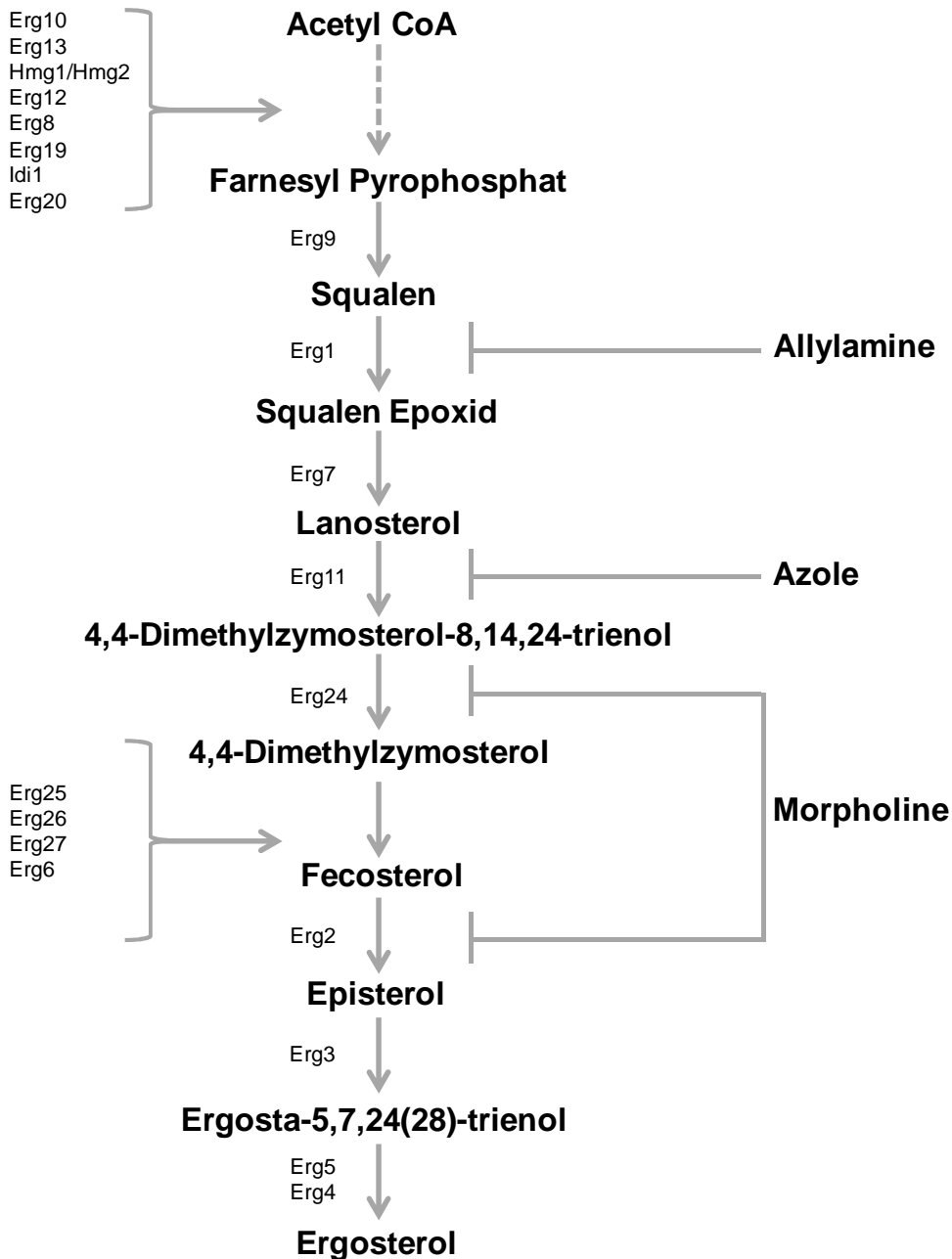
sind spezifische Inhibitoren der Glukan-Synthese. Sie binden an eine Untereinheit der  $\Delta$ -(1,3)-Glukan-Synthase und hemmen somit die Synthese des Zellwandbausteins  $\Delta$ -(1,3)-Glukan. Fehlt dieses Glukan-Polymer ist das in der Regel letal für den Pilz (Sanglard und Odds, 2002; Morschhäuser, 2003; Akins, 2005).

**Flucytosin**, ein Pyrimidin, hemmt die Synthese der Nukleinsäuren von pathogenen Hefen und wird oft in Kombination mit Polyenen und Triazolen verwendet, vor allem seit eine Zunahme von Resistenzen gegen Azole in *Candida* spp. beobachtet werden (Sanglard und Odds, 2002). Das Basenanalogen Flucytosin wird über einen spezifischen Transporter in die Zelle aufgenommen und dort von der Cytosin-Deaminase und Uracil-Phosphoribosyltransferase zunächst in 5-Fluor-Uracil und anschließend in 5-Fluor-Uridin Monophosphat (F-UMP) umgewandelt. Dieses Produkt wird in die RNA eingebaut und bewirkt eine Synthese von fehlerhafter RNA, wodurch das Wachstum gehemmt wird. Zudem wird das Zwischenprodukt 5-Fluor-Uracil auch zu F-dUMP umgesetzt, welches die Thymidylat-Synthase und somit die DNA-Synthese hemmt. Da die Cytosin-Deaminase in Humanzellen nicht vorkommt, besitzt Flucytosin eine niedrige Toxizität.

Auch die Proteinsynthese kann als Angriffspunkt dienen. Hier interagiert das noch in der Entwicklung stehende Sordarin durch Stabilisierung des Ribosom / EF2-Komplexes (Loeffler und Stevens, 2003; Morschhäuser, 2003; Akins, 2005; Lupetti et al., 2002; Liang, 2008).

**Benzimidazole**, wie Benomyl und Nocodazol, und Benzofurane, wie Griseofulvin, stören die Zellteilung. Mikrotubuli sind ein wichtiger Teil des eukaryotischen Cytoskeletts und sind sowohl bei der Teilung der Chromatiden als auch bei der Erhaltung der Zellform während der Interkinese involviert. Die Benzimidazole interagieren mit dem  $\beta$ -Tubulin der Mikrotubuli und stören deren Aufbau.

**Benzofurane** hingegen wirken durch Komplexbildung mit Purinen, was zu Störungen in der mRNA-Synthese führt, die Kernteilung beeinträchtigt und durch Interferenz mit der Chitin-Synthese zu einem fehlerhaften Zellwandaufbau führt. Die Zelle zerplatzt unter längerer Gabe des Antimykotikums (Odds et al., 2003; Tietz, 2011).



**Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Ergosterol-Biosynthese unter Angabe der wichtigsten Zwischenprodukte**

An der Synthese beteiligte Proteine / Gene sind links, Angriffspunkte verschiedener Antimykotika rechts angegeben (Verändert nach Onyewu et al., 2003).

Pilze gehören, wie der Mensch, zu den Eukaryoten. Daher kommen in der Pilzzelle viel weniger Angriffspunkte für Wirkstoffe in Frage als dies für Prokaryoten, wie Bakterien, der Fall ist. Die Identifizierung neuer gut verträglicher Antimykotika ist daher viel schwieriger als neue antibiotische Wirkstoffe zu finden. Bei den Triazolen steht zwar ein erweitertes Spektrum an Antimykotika zur Verfügung, aber alle diese Wirkstoffe wie Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol haben den selben

Wirkungsmechanismus wie Fluconazol und sind in den meisten Fällen von denselben Resistenzmechanismen betroffen (Pfaller und Diekema, 2007).

### **1.3 Resistenzmechanismen gegenüber Antimykotika in *C. albicans***

Als Resistenz bezeichnet man die nicht vorhandene Empfindlichkeit eines Pilzes gegen eine antimykotische Substanz. Gemessen wird diese in einem *in vitro* Test, bei welchem der MHK, die minimale Hemmkonzentration, der Substanz bestimmt wird, die bei Resistenz den normalen Wert, bei dem die Substanz gegen den Pilz wirkt, überschreitet.

Resistenz kann primär, auch als intrinsische Resistenz bezeichnet, oder sekundär, eine erworbene Resistenz, sein.

Die primäre Resistenz kommt bei einigen Pilzen ganz natürlich vor ohne, dass der Pilz zuvor der Substanz ausgesetzt wurde. So ist diese in *C. krusei* für Fluconazol und in *Cryptococcus neoformans* für Echinocandine zu finden. Die erworbene Resistenz entwickelt sich bei zuvor empfindlichen Stämmen nach Antimykotika-Gabe und ist normalerweise von einer geänderten Genexpression oder Mutation abhängig, wie das bei der Fluconazol-Resistenz von *C. albicans* der Fall ist (Kanafani und Perfect, 2008; Loeffler und Stevens, 2003). Probleme bereiten nicht nur intrinsisch resistente Pilzspezies, sondern vor allem auch die Resistenzentwicklung in normalerweise sensitiven Arten. Heutzutage werden vermehrt resistente *C. albicans*-Isolate gefunden. Die ursprünglich meist sensitiven Stämme entwickeln häufig im Rahmen einer Langzeittherapie oder durch Anwendungsfehler eine Resistenz gegenüber dem verwendeten Antimykotikum. Unter den verschiedenen Kategorien an Antimykotika ist die Resistenzentwicklung gegen Azole das relevanteste medizinische Problem.

Bei der Resistenzentwicklung eines Pilzes gegen ein eingesetztes Medikament spielen oft verschiedene zelluläre Veränderungen eine Rolle, die im Folgenden erläutert werden. Es kann mehr als ein Resistenz-Mechanismus in einem Pilzstamm zu finden sein und diese können additive Effekte haben (Lupetti et al., 2002; Sanglard et al., 1996; Morschhäuser, 2003; Sanglard et al., 1998; Orozco, 1998). Die Mechanismen einer Azolresistenz in *Candida* können in vier Kategorien eingeteilt werden:



### **Änderung am Angriffspunkt in der Zelle:**

Der Angriffspunkt der Azole ist die Sterol-C14-Demethylase. Mutationen in *ERG11*, dem Gen, das für die Sterol-C14-Demethylase codiert, verhindern die Bindung des Azols im aktiven Zentrum des Enzyms. Azole binden an die Häm-Gruppe im aktiven Zentrum der Sterol-C14-Demethylase, wodurch die Bindung des Substrats verhindert wird. Eine verminderte Bindungsaffinität dieses Enzyms zu den Azolen scheint der Grund für die intrinsische Resistenz von *C. krusei* zu sein. Bei der Untersuchung von Azol-resistenten *C. albicans*-Isolaten konnten unterschiedliche Mutationen in der Gensequenz von *ERG11* identifiziert werden. Dabei werden mindestens zwölf verschiedene Punktmutationen innerhalb des *ERG11*-Gens mit einer verringerten Azol-Affinität und einer daraus resultierenden Resistenz in Verbindung gebracht (Sanglard und Odds, 2002; Morschhäuser, 2003; Kanafani und Perfect, 2008).

### **Überexpression des Zielenzym:**

Einige resistente *Candida*-Isolate haben eine höhere intrazelluläre Konzentration an ERG11p als Azol-sensitive Stämme. Die verstärkte Expression eines Zielgens wie *ERG11* kann eine Azol-Resistenz verursachen oder zumindest verstärken. Da die Gesamtaktivität der Sterol-C14-Demethylase effizient inhibiert werden muss, kann eine verstärkte Expression des Enzyms dazu führen, dass die Konzentration eines Antimykotikums nicht mehr ausreicht, um die Ergosterol-Biosynthese zu inhibieren. Auch die künstliche Überexpression des *ERG11*-Gens reduziert die Sensitivität auf Fluconazol deutlich (Sanglard und Odds, 2002; Morschhäuser, 2003; Morschhäuser, 2002).

### **Änderungen in der Sterol-Biosynthese und somit in der Sterolzusammensetzung durch Entstehung von Nebenwegen in der Synthese**

Setzt man die pilzliche Zellmembran Azolen aus wird die Lanosterol-C14-Demethylase inhibiert und es reichert sich Lanosterol an. Lanosterol wird von anderen Enzymen in weitere Zwischenprodukte umgesetzt, unter anderem zu 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Dies resultiert letztendlich in einer Abnahme es Ergosterols in der Membran und einer Akkumulation des als toxisch beschriebenen 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, was zu einer Wachstumsinhibierung führt. Eine Mutation im *ERG3*-Gen, das für die Sterol- $\Delta$ 5,6-Desaturase codiert verhindert jedoch die Bildung von Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol aus 14 $\alpha$ -methylfecosterol. Der Austausch des Ergosterols durch 14 $\alpha$ -methylfecosterol führt zu einer teilweise funktionsfähigen

Membran, wodurch Azole keinen Schaden durch ihren Eingriff in die Biosynthese verursachen können. *Candida*-Isolate mit einer entsprechenden *ERG3*-Mutation sind ebenso gegen Polyene resistent, da deren Angriffspunkt, das Ergosterol nun nicht in der Membran vorhanden ist (Kanafani und Perfect, 2008; Sanglard und Odds, 2002; Morschhäuser, 2003).

### **Überexpression von Genen, die für Effluxpumpen kodieren**

Viele Azol-resistente *Candida*-Isolate akkumulieren intrazellulär nicht genügend hohe Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffs. Dies ist meistens auf ein aktives Ausschleusen der Substanz aus der Zelle zurückzuführen, was durch eine Überexpression der spezifischen Effluxpumpen ausgelöst wird. Efflux ist damit ein wichtiger Mechanismus für die Azol-Resistenz. Es gibt in *C. albicans* zwei unterschiedliche Arten von Effluxpumpen: Die ABC (ATPbinding cassette)-Transporter, die ATP als Energiequelle für den Transport verwenden. Zu ihnen gehören Cdr1p und Cdr2p. Die andere Art sind die sogenannten „major facilitators“ (MF), wie beispielsweise Mdr1, die das Membranpotenzial als Energiequelle nutzen (Morschhäuser, 2003). In resistenten Isolaten sind die dafür codierenden Gene (*CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, u.a.) dementsprechend hochreguliert (Morschhäuser, 2003). Der entscheidende Unterschied zwischen den ABC-Transportern und den MFs besteht darin, dass die ABC-Transporter fast das gesamte Spektrum an Azol-Antimykotika als Substrat verwenden können, wodurch ihre Überexpression eine Kreuzresistenz gegenüber verschiedenen Antimykotika bewirken kann. Für die MF-Transporter ist das bevorzugte Substrat Fluconazol (Sanglard und Odds, 2002). Eine Übersicht möglicher Resistenzmechanismen gegen Azole ist in Abbildung 4 dargestellt.

Weitere eher seltene Mechanismen für Resistenzen sind zum einen, dass der Eintritt des Wirkstoffs in die Zelle direkt verhindert wird, zum anderen können die pilzlichen Mediatoren, welche eine inaktive Substanz (Prodrug, wie zum Beispiel Flucytosin) in eine aktive umwandeln inhibiert sein. Möglich ist auch, dass die Zelle Enzyme in das extrazelluläre Medium abgibt, welche den Wirkstoff abbauen.

Neben den Resistenzen bei den Azolen sind auch für andere Antimykotika-Klassen Resistenzen bekannt. Die Mechanismen sind dabei sehr verschieden und sind im Folgenden aufgeführt:

Der Wirkmechanismus von **Echinocandine** hingegen unterscheidet sich deutlich von dem der Azole und somit haben Mutationen im Ergosterol-Biosynthese-Weg keinen

Einfluss auf die Sensitivität der Pilze gegen Echinocandine und sie wirken auch gegen Azol-resistente *Candida*-Isolate. Zudem scheinen Wirkstoffe wie Caspofungin auch kein bevorzugtes Substrat für die bekannten Effluxpumpen zu sein. Resistente Isolate besitzen stattdessen eine Punktmutation im FKS1-Gen, welches für die katalytische Untereinheit der  $\beta$ -1,3-Glukansynthase kodiert. Für Echinocandine wurden bisher keine Kreuzresistenzen mit anderen Wirkstoffen beobachtet (Morschhäuser, 2003; Akins, 2005).

Da **Polyene**, wie Amphotericin B, wegen der mit ihnen verbundenen Toxizität nur für kurze Behandlungen eingesetzt werden, treten Resistenzen gegen diese Substanzklasse in klinischen *Candida*-Isolaten eher selten auf. Eine Azol bedingte Inhibierung der Ergosterol-Biosynthese kann auch zu einer erhöhten Amphotericin B-Resistenz führen, da Ergosterol die primäre Bindungsstelle für Amphotericin B darstellt. Auch Mutationen oder eine Überexpression von Genen der Ergosterol-Biosynthese können zu einem reduzierten Ergosterolgehalt in der Zellmembran führen. Dadurch fehlt der Angriffspunkt für das Polyen (zum Beispiel *ERG3*-Mutationen, siehe oben) kommt zu einer verringerten Bindung des Antimykotikums. Amphotericin B-resistente *Candida*-Stämme zeigen in der Regel einen geringen Ergosterolgehalt in der Membran im Vergleich zu Amphotericin B-sensitiven Kontroll-Isolaten.

Eine weitere mögliche Ursache für eine Amphotericin B-Resistenz könnte ein veränderter  $\beta$ -1,3-Glukan-Gehalt in der Zellwand des Pilzes sein.  $\beta$ -1,3-Glukan erhöht die Stabilität der Zellwand, was Einfluss auf den Zugang großer Moleküle wie Polyene zur Plasmamembran hat (Loeffler und Stevens, 2003; Morschhäuser, 2003; Akins, 2005; Lupetti et al., 2002).

Für das Basenanalogen **Flucytosin** sind zwei Resistenzmechanismen bekannt. Beim ersten Mechanismus verursachen Mutationen eine verringerte Aktivität der Cytosin-Permease oder Desaminase, was zu einer verminderten Aufnahme bzw. Umwandlung des Wirkstoffs führt. Dieser Mechanismus ist u.a. auch für die intrinsische Resistenz gegen Flucytosin verantwortlich. Der zweite Mechanismus und die häufigste Ursache für Resistenzen sind jedoch Mutationen im *FUR1*-Gen, das für die UMP-Pyrophosphorylase codiert. Veränderungen in diesem Enzym führen dazu, dass Flucytosin nicht mehr in das für den Pilz toxische F-UMP umgewandelt werden kann. Bei Monotherapien treten so häufig klinische Resistenzen auf, daher wird Flucytosin

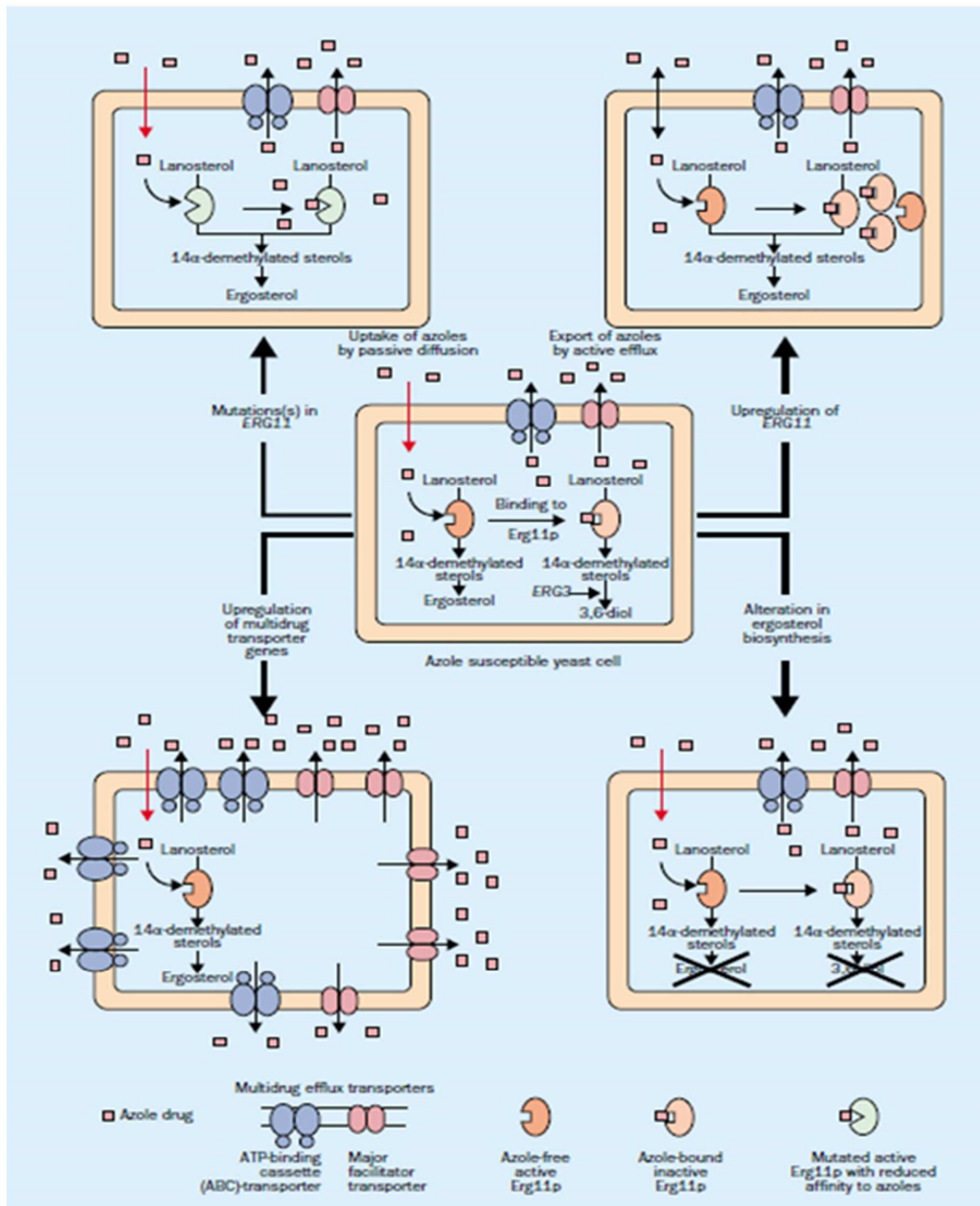
fast ausschließlich in Kombination mit Amphotericin B eingesetzt (Loeffler und Stevens, 2003; Morschhäuser, 2003; Kanafani und Perfect, 2008).

### **Resistenzmechanismen in *C. krusei*:**

Für *C. krusei* wurde gezeigt, dass der Cytochrom P450-Gehalt dem von *C. albicans* sehr ähnlich ist. Da die 14 $\alpha$ -Demethylase den größten Teil des Cytochrom P450 in Hefen ausmacht, weist dies darauf hin, dass der Mechanismus der Fluconazol-Resistenz in *C. krusei* nicht durch eine Überproduktion des Zielenzym vermittelt wird.

*C. krusei* scheint durch einen Mechanismus gegen Fluconazol resistent zu sein, der unabhängig von einer reduzierten Fluconazol-Akkumulation ist (Orozco, 1998).

Aufgrund der Entwicklung zahlreicher unterschiedlicher Resistenzmechanismen gegen bislang verfügbare Antimykotika, besteht ein großer Bedarf, neue wirkungsvolle Substanzen zu finden und weiterzuentwickeln. In den letzten Jahren gab es einen großen Fortschritt bei der Identifizierung von Genen, die für Resistenzen von *C. albicans* verantwortlich sind. Dabei liegt die größte Aufmerksamkeit auf fünf Haupt-Genen: Die ABC-Transporter-Gene *CDR1* und *CDR2*, dann *MDR1*, das beim Efflux essentiell ist und *ERG11* und *ERG3* aus der Ergosterol-Biosynthese (Akins, 2005).



**Abbildung 4: Mögliche Resistenzmechanismen gegen Azole in Hefen**

In der Mitte ist ein Azol-sensitives Isolat gezeigt, in welchem sich Azole als Resultat passiver Diffusion anreichern. Das Azol bindet an *Erg11* und inhibiert die Ergosterolbildung durch das Blockieren der Lanosterol-C14-Demethylase. Des Weiteren sind die momentan angenommenen vier verschiedenen Wege, die zu einer Azol-Resistenz führen können, dargestellt (Nach Sanglard und Odds, 2002).

## 1.4 Die Ergosterol-Biosynthese

Die Ergosterol-Biosynthese findet im Endoplasmatischen Reticulum statt und ist der bedeutendste Angriffspunkt für Antimykotika in der Pilzzelle. Azole, Morpholine und Allylamine interagieren mit diesem Syntheseweg und Polyene mit dessen Produkt Ergosterol. Dieses Sterol ist einer der wichtigsten Bestandteile der Zellmembran und ist an wichtigen Funktionen der Zelle beteiligt. Dazu gehören die Modulation der Membranfluidität und deren Integrität. Zudem sorgt Ergosterol durch seinen Einbau in die Phospholipid-Doppelschicht für Festigkeit und Struktur, um die nötige Membranpermeabilität und die optimale Funktion zahlreicher membranständiger Enzyme zu gewährleisten. Dies sind beispielsweise Proteine, die als Nährstofftransporter oder in der Chitin-Synthese beteiligt sind (Membran-ATPase, Chitinsynthetase, u.a.) (Odds et al, 2003; Tietz, 2011; Lupetti et al., 2002; Ghannoum und Rice, 1999; Morschhäuser, 2003). Ergosterol ist darüber hinaus eine Hauptkomponente der sekretorischen Vesikel in *Saccharomyces cerevisiae* und hat eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Atmungskette in der Pilzzelle. Humanzellen enthalten das Sterol Cholesterol, was dem Ergosterol sehr ähnlich ist. Die Biosynthesen der beiden Sterole verlaufen sehr ähnlich, aber nicht identisch und auch die Enzyme in den Synthesewegen sind nicht identisch und können selektiv durch Inhibitoren beeinflusst werden. Von Ergosterol ist zudem bekannt, dass große Mengen (ca. 15 g/ml) benötigt werden, daher spricht man von einer „bulk“-Funktion. Dies geht auch mit einer relativ großen Strukturtoleranz einher. So können andere Sterole mit ähnlicher Struktur diese Funktion ebenfalls erfüllen, dabei sind, um das Pilzwachstum überhaupt zu initiieren, aber immer Spuren von Ergosterol (10 ng/ml) nötig. Neben dieser Aufgabe des Ergosterols gilt es auch als Wachstumspromotor. Dies wird als „sparking“- Funktion bezeichnet und bedingt eine deutlich exaktere Struktur des Sterols. Die weiteren Aufgaben des Ergosterols im Pilzwachstum sind bis heute nicht ganz geklärt (Bracher, 2003).

Wird die Ergosterol-Biosynthese beeinträchtigt, führt dies zu einem Mangel an Ergosterol und zu einer Akkumulation von Biosynthese-Vorstufen des Sterols. Dadurch kommt es zu einer veränderten Lipidzusammensetzung der Pilzmembran. Die Folge sind Funktionsstörungen membranständiger Enzyme, v.a. der Chitinsynthetase und aufgrund erhöhter Membranpermeabilität kann dies auch einen Austritt essenzieller Zellbestandteile verursachen. Dies kann wiederum in einer

Hemmung des Wachstums oder sogar im Absterben der Pilze resultieren (Bracher, 2003).

Die Ergosterol-Biosynthese wandelt Essigsäure in Ergosterol um. Dabei kommen größtenteils dieselben Enzyme wie in der Biosynthese des Cholesterol bei Säugetieren zum Einsatz. Die Synthese von Ergosterol kann in zwei Abschnitte unterteilt werden.

Der sogenannte „Prä-Squalen-Abschnitt“ verläuft bei Pilz-, Pflanzen- und Säuger-Zellen identisch. Dabei wird aus Acetyl-CoA über HMG-CoA, Mevalonsäure und Farnesyldiphosphat schrittweise das Triterpen Squalen aufgebaut. Die Gene in diesem Abschnitt vor *ERG11* sind essentiell in *S. cerevisiae*.

Darauf folgt der zweite Abschnitt, der sogenannten „Post-Squalen-Abschnitt“. In diesem wird Squalen in Ergosterol umgewandelt. Lanosterol ist das erste Sterol in der Synthese von knapp zwanzig Sterol-Intermediaten innerhalb der Biosynthese und auch die letzte gemeinsame Vorstufe der Ergosterol-Biosynthese und der Cholesterolbiosynthese. Lanosterol ist das Substrat des Enzyms Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase, welche von *ERG11* kodiert wird. Der erste Schritt ist dabei eine oxidative Abspaltung der Methylgruppe an C-14 durch das Enzym zu Dimethylcholestatrienol. Azole wie Fluconazol inhibieren exakt an diesem Enzym die Synthese. Wichtige weitere Schritte bei der Ergosterol-Biosynthese sind die Reduktion einer Doppelbindung mit Hilfe der  $\Delta^{14}$ -Reduktase zu Dimethylergostadienol und eine Doppelbindungsisomerisierung von Fecosterol zu Episterol durch die  $\Delta^8, \Delta^7$ -Isomerase (Bracher, 2003; Nes, 2011; Staudacher, 2012; Akins, 2005; Müller et al., 2013).

Eine Übersicht wichtiger Enzyme und die dafür jeweils kodierenden Gene der Ergosterol-Biosynthese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Übersicht wichtiger Enzyme der Ergosterol-Biosynthese unter Angabe der kodierenden Gene**

Enzym aus Ergosterol-Biosynthese:	kodiert von Gen:
Sterol-C14-Demethylase / Lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase	Erg11
$\Delta^{14}$ -Reductase	Erg24
Sterol-C4-Demethylase-Komplex	Erg25, Erg26, Erg27
C24-Methyltransferase	Erg6
$\Delta^{7/8}$ -Isomerase	Erg2
Sterol-C5-Desaturase	Erg3
Sterol-C22-Desaturase	Erg5
$\Delta^{24(28)}$ -Reductase	Erg4

### 1.4.1 Das Enzym Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase

Die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (Erg11p) ist ein Cytochrome P450-Enzym und gilt als Schlüsselenzym der Ergosterol-Biosynthese. Azole wie Fluconazol inhibieren Erg11p, das von *ERG11* kodiert wird, und das Sterol Lanosterol reichert sich an. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Entfernung der 14 $\alpha$ -Methyl-Gruppe von Lanosterol. Azole binden das Häm im aktiven Zentrum der 14 $\alpha$ -Demethylase und wetteifern bei der Bindung mit Substrat. Diesem Mechanismus verdanken Azole ihre antimykotische Wirkung (Kelly, 1995; Sanati et al., 1997; Morschhäuser, 2002).

Dadurch ist der Syntheseweg aber nicht vollständig geblockt. Andere Enzyme setzen Lanosterol in weitere Zwischenstufen um. Dies führt es zu einer Anreicherung von 14-Methylsterolen wie Lanosterol, 4,14-Dimethylzymosterol und 24-Methylenedihydrolanosterol und zu einer Abnahme von Ergosterol in der Plasmamembran. Diese neue Sterolzusammensetzung resultiert in der Bildung einer Plasmamembran mit veränderter Struktur und Funktion. Zu den akkumulierenden 14-Methylsterolen gehört auch 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, was als potentiell toxisch gilt (Ghannoum und Rice, 1999; Morschhäuser, 2003; Lupetti et al., 2002; Sanglard et al., 1996).

Wie schon beschrieben, geht man davon aus, dass die gestörte Sterolzusammensetzung und dabei vor allem die Anreicherung des 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -Diol zu einer Wachstumsinhibition führen kann. In Hefen mit einem defekten *ERG11*, was stringenten Azoldruck imitiert, korreliert der Wachstumsstopp mit der Akkumulation dieses toxischen Diols. Die Zellen können diesen Effekt aber durch eine Mutation in der 5,6-Desaturase ausgleichen und so Azol-resistent werden (Parker et al., 2008; Lupetti et al., 2002; Akins, 2005; Kelly, 1995).

## 1.5 Neue antimykotische Wirkstoffe

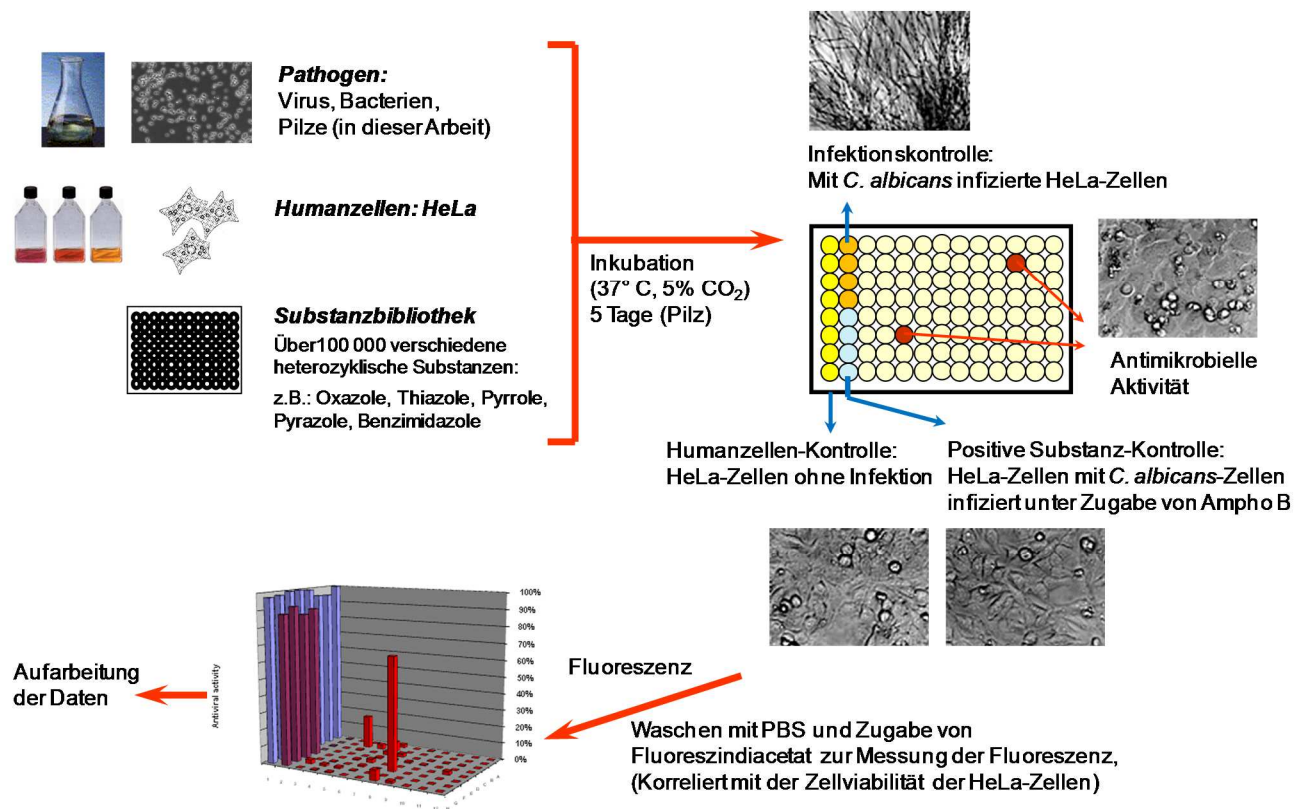
Der Bedarf an neuen Antimykotika ist groß, da die Zahl der Pilzinfektionen, insbesondere im Bereich immunsupprimierter Patienten, stark zunimmt. Die Mortalitätsrate bei systemischen Mykosen liegt bei 46-75 % liegt und bei *Aspergillus* spp. sogar bei 90 % (Pfaller und Diekema, 2007; Hof, 2003).

Die Schwierigkeit bei der Suche nach neuen antimykotischen Wirkstoffen besteht darin, dass Pilze ebenso wie Säuger zur Domäne der Eukaryoten gehören und deshalb viele Ähnlichkeiten zwischen den Synthesewegen sowie potentiellen Targets



zwischen Mensch und eukaryotischen Pathogen bestehen. Ein Beispiel ist die Ähnlichkeit von Ergosterol und Cholesterol. Dadurch ergeben sich viel weniger Angriffspunkte für Wirkstoffe als bei prokaryotischen Pathogenen. Moderne Antimykotika wie Echinocandine oder neue Azole sind zudem sehr teuer und viele gebräuchliche Antimykotika haben teils starke Nebenwirkungen. Darüber hinaus steht zur Behandlung von Pilzinfektionen bislang nur eine geringe Anzahl an Medikamenten überhaupt zur Verfügung und die häufig angewandte, prophylaktische Verwendung im Klinikalltag, insbesondere von Azolen, kann neu entstehende Resistenzen weiter fördern. Die Aufklärung der Resistenzmechanismen und die Identifizierung neuer antimykotischer Wirkstoffe zur Entwicklung neuer Medikamente, die solche Resistenzen umgehen oder gegen resistente Stämme wirken, sind deshalb von großer Wichtigkeit. Daher sollen neue Substanzen insbesondere gegen noch nicht adressierte Zielstrukturen im Pilz entwickelt werden (Morschhäuser, 2003; Odds et al., 2003; Ghannoum und Rice, 1999; Anaissie et al., 1993).

Zur Identifizierung neuer Wirkstoffe mit breiter, aber für Pilze selektiver, antimykotischer Aktivität und für das Screening umfangreicher Substanzbibliotheken wurde ein High-Throughput-Screening Activity-Selectivity Assay (AS-HTS-Assay) eingesetzt. Mit diesem Assay können neue potente antimykotische Wirkstoffe identifiziert, evaluiert und optimiert werden. Mit dem Screening ist es möglich die antimykotische Wirkung und die Kompatibilität einer Substanz mit Humanzellen gleichzeitig zu analysieren. Das genaue Screening ist bei Burger-Kentischer et al., 2010 beschrieben. Eine schematische Übersicht zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des AS-HTS-Assays**

Nach 5 tägiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kann, sowohl durch einen Farbumschlag des Mediums, als auch mikroskopisch, eine antimikrobielle Aktivität erkannt werden. Die Messung der Fluoreszenz und damit der vitalen humanen HeLa-Zellen gibt genauere Information wie hoch diese antimikrobielle Aktivität ist.

Mit dem Einsatz dieses neuartigen Screening-Verfahrens kann die Entwicklung bereits identifizierter antimykotisch wirksamer Leitstrukturen und noch nicht erschlossener Substanzquellen erfolgen (Pfaller und Diekema, 2007; Messer et al., 2006; Ghannoum und Rice, 1999; Burger Kentischer et al., 2010; Bauer et al., 2011).

Dieser Assay stellt die kleinste Einheit einer natürlichen Infektion nach. Die Wirtszellen und das Pathogen, z.B. *Candida* spp. werden zusammen mit einer potentiell antimykotischen Substanz im 96-Well-Format inkubiert, so wird die Wirtsnische optimal simuliert. Dadurch können alle möglichen Targets des Pathogens und der Wirtszelle simultan angesprochen und getestet werden. Gleichzeitig ist die Wirkung der Stoffe auf die Wirtszellen durch Messung der Vitalität der Zellen direkt messbar. Anders als bei konventionellen Wirkstoffscreenings, bei denen der Effekt einer Substanz nur auf das Pathogen detektiert wird, werden hier die humanen Zellen in den Test einbezogen. Damit ermöglicht dieser Assay verträgliche und antiinfektiv wirksame Substanzen für eine medikamentöse Therapie zu identifizieren, zu evaluieren und zu optimieren.

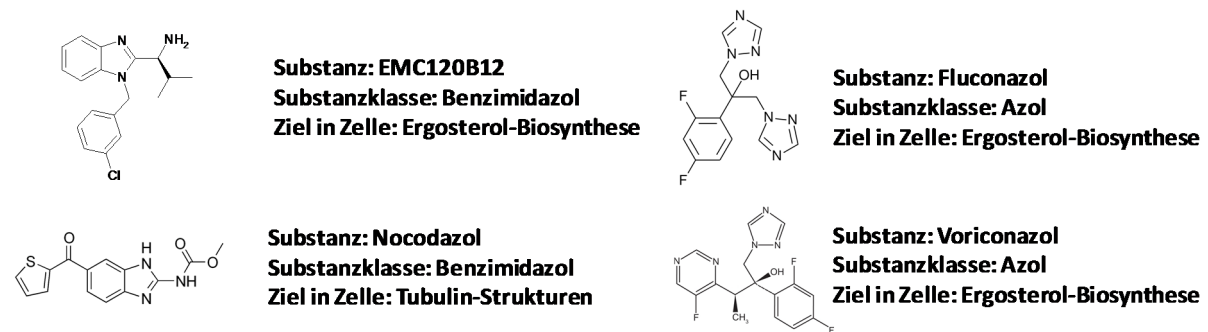
Der große Vorteil des AS-HTS-Assay ist somit, dass antimykotische Aktivität und die Verträglichkeit der Wirkstoffe auf Wirtszellen und deren Toxizität in einem Schritt beurteilt werden können. Zudem kann mit diesem Assay auch durch eine Verdünnungsreihe die optimale Konzentration und der MHK, für eine erfolgreiche Hemmung des Pilzwachstums bestimmt werden, bei der gleichzeitig eine gute Verträglichkeit für die Wirtszellen gewährleistet ist. Nach dem Screening sind gegen das Pathogen zwar wirksame, aber für Wirtszellen toxischen, Verbindungen gleich aussortiert. Bei konventionellen Screenings wird im Wesentlichen nur beurteilt, ob der Pilz wächst oder das Wachstum durch die Testsubstanz gehemmt wird. Die Toxizität für Wirtszellen kann in dem Ansatz nicht beurteilt werden. Zudem haben potentielle Wirkstoffe, abhängig von der Umgebung in der sie getestet werden, verschiedene Effekte. Da beim AS-HTS-Assay die Substanzen im Wirts-Kontext untersucht werden und das *in vitro*-System die Wirtsnische und die Interaktion mit Epithelzellen simuliert, kann die Wirkung von Substanzen durch diesen Kontakt des Pathogens mit den Wirtszellen anders ausfallen als unter den für klassische Screeningsbedingungen. Bei Screenings ohne Wirtszellen ist alles nur auf ein optimales Wachstum des Pathogen ausgelegt. Dabei werden gewisse Gene, die nur in der Interaktion mit der Wirtszelle reguliert werden, nicht angesprochen.

Im AS-HTS-Assay entfaltet das Pathogen in der natürlichen Wirts-Umgebung sofort sein pathogenes Potenzial und exprimiert jene Proteine, die für eine Invasion in die Wirtszelle benötigt werden. Dies kann den Testsubstanzen als Angriffsziel dienen (Anaissie et al., 1993; Burger-Kentischer et al., 2010).

## 1.6 Die neue antimykotische Substanz EMC120B12

Mit dem AS-HTS-Assay wurde eine große Substanz-Bibliothek mit mehr als 100 000 potentiellen Wirkstoffen gegen *C. albicans* getestet. Hierbei konnte ein Benzimidazol-Derivat (S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazol (Abbildung 6) mit hoher antimykotischer Aktivität gegen verschiedene pathogene Hefen und einer guten Verträglichkeit für Humanzellen gefunden werden. Zu diesen pathogenen Hefen zählen neben *C. albicans* auch Spezies wie *C. glabrata* and *C. krusei*, bei welchen die Behandlung mit gängigen Antimykotika, vor allem Azolen, schwierig ist. Auch weitere Derivate der gleichen Ausgangsstruktur wurden hergestellt und getestet, doch keines zeigte eine so gute Aktivität. Für die gefundene, vielversprechende Ausgangsverbindung namens EMC120B12 wurden erste MHK-Bestimmungen

durchgeführt. Diese zeigten, dass EMC120B12 gegen die meisten pathogenen Hefen wirksam ist. Auch gegen den intrinsisch gegen Fluconazol resistenten Pilz *C. krusei* wirkt EMC120B12 und ebenso gegen viele andere Fluconazol-resistente *Candida*-Stämme. Vorangegangene Microarray Experimente weisen darauf hin, dass der Syntheseweg in den EMC120B12 eingreift, wie bei den Azolen, der Ergosterol-Biosyntheseweg ist (Burger Kentischer et al., 2010; Bauer et al., 2011).



**Abbildung 6: EMC120B12 im Vergleich mit anderen Antimykotika**

EMC120B12 ist ein Benzimidazol, interagiert aber wie ein Azol in der Ergosterol-Biosynthese und stört nicht wie andere Benzimidazole die Bildung von Tubulin-Strukturen (Quelle Strukturformeln: sigmaaldrich.com, wikipedia.org).

## 1.7 Sterolanalytik

Die Ergosterol-Biosynthese ist in Pilzen und Hefen einer der entscheidenden Angriffspunkte für Antimykotika. Verschiedene Klassen von Antimykotika inhibieren unterschiedliche Enzyme dieses Biosynthesewegs.

Analysiert man die Sterolmuster eines Pathogens nach Inkubation mit einem Inhibitor, ist die Identifikation der Zielenzyme im Organismus möglich. Hemmt der Wirkstoff ein oder mehrere Enzyme der Biosynthese, dann ändert sich das Sterolmuster des Pilzes merklich. So kann durch die Analyse von Sterolmustern der Effekt einer Substanz auf die Ergosterol-Biosynthese untersucht werden. Dies geschieht durch einen Vergleich der Sterole nach Inkubation des Pilzes mit einem Inhibitor im Vergleich zur nicht inhibitorischen Situation, woraus Rückschlüsse auf die beeinflussten Enzyme gemacht werden können (Bracher, 2003; Orozco et al., 1998).

Eine etablierte und gut geeignete Methode für die Detektion und Identifizierung von Sterolen stellt die Gaschromatographie gekoppelt mit der Ionenfallen-Massenspektrometrie (GC/MS) dar. Hierbei wird ein Stoffgemisch über eine Trennsäule eines Gaschromatographen aufgetrennt. Anschließend werden die einzelnen aufgetrennten Komponenten mit Hilfe des Massenspektrometers

identifiziert. Die Methode ist sehr sensitiv und selbst minimalste Mengen von Substanzen können damit nachgewiesen und analysiert werden. Dabei werden sowohl die Retention der Sterole an der Trennsäule, wie auch das erzeugte MS-Spektrum zur Identifizierung herangezogen. Durch chemische Derivatisierung wird die zu untersuchende Probe in die Gasphase überführt und mit Hilfe eines Trägergases wie Helium oder Stickstoff über die Trennsäule transportiert. Durch unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften der einzelnen Komponenten des Stoffgemisches entstehen Wechselwirkungen zwischen diesen und der stationären Phase. Diese physiko-chemischen Eigenschaften sind von der Struktur und den funktionellen Gruppen abhängig und führen zu einer charakteristischen Mobilität der einzelnen Komponente in der Trennsäule. Jede Verbindung verbleibt je nach Interaktion mit der stationären Phase unterschiedlich lange in der Säule. Mit einem Detektor am Ende wird die Zeit gemessen, die eine Verbindung zum Durchlaufen der Säule benötigt. Diese Zeit wird als Retentionszeit bezeichnet.

Im Anschluss werden die Verbindungen zunächst ionisiert und in der Ionenfalle durch elektrische und magnetische Felder festgehalten. Dabei finden die Ionisation, die Fragmentierung, die Speicherung und die Massenanalyse am selben Ort statt. Danach besitzt jedes Molekül ein anderes Masse-Ladung-Verhältnis ( $m/q$  bzw.  $m/z$ ). Nach diesem Verhältnis wird es sortiert und dabei bei Bedarf auch fragmentiert.

Durch Veränderung der Spannung können die Ionen nun gezielt aus der Falle entlassen werden und gelangen so in den Elektronenvervielfacher (Multiplifier). Dessen elektrisches Signal erzeugt die Massenspektren (March, 1997; Giera et al., 2007; Müller et al., 2013; Sanati et al., 1997).

Handelt es sich bei der gemessenen Probe um eine Sterolmischung, erfolgen die Identifizierung der akkumulierenden Sterole und der damit in Zusammenhang stehenden Enzyme über einen Vergleich der charakteristischen Massenspektren mit den relativen Retentionszeiten. Anschließend wird das Ergebnis mit einer Datenbank bekannter Sterole abgeglichen und so die akkumulierenden Sterole genau identifiziert.

## 1.8 Zielsetzung

Die Identifizierung und Optimierung neuer antimykotisch wirksamer Substanzen gegen humanpathogene Pilze ist schwierig und mit den gängigen Screenings aufwendig. Wirksame Verbindungen können erst in weiteren Tests auf Toxizität geprüft werden. Da Pilze zu den Eukaryoten zählen, kommen nur wenige Angriffspunkte in der Pilzzelle in Frage. Zudem ist die Medikamentenentwicklung aus neuen Wirkstoffen teuer und oft haben die Substanzen oft erhebliche Nebenwirkungen. Der in dieser Arbeit verwendete AS-HTS-Assay vermag die antimykotische Aktivität gegen *C. albicans* und die Verträglichkeit der Wirkstoffe auf Wirtszellen und deren Toxizität in einem Schritt zu beurteilen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es dieses einmalige Screeningverfahren weiter zu optimieren, für weitere humanpathogene Pilze zu adaptieren und validieren, sowie weitere Substanzbibliotheken auf potentielle Wirkstoffe zu screenen. Die mit dem AS-HTS-Assay bereits identifizierte Substanz EMC120B12 erwies sich aufgrund ihrer stark antimykotischen Wirkung und gleichzeitig guten Verträglichkeit mit Humanzellen als vielversprechender potentieller Wirkstoff. Das Transkriptom von mit dem Benzimidazol EMC120B12 behandelten Zellen wies bereits darauf hin, dass die Substanz, wie für Azole typisch, in die Ergosterol-Biosynthese eingreift. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es den genauen Wirkungsmechanismus zu verifizieren und den Angriffspunkt, beziehungsweise das Zielenzym, in der Ergosterol-Biosynthese zu identifizieren. Hierzu werden vergleichende Transkriptionsanalysen in An- und Abwesenheit von dem Benzimidazol Nocodazol, dem Azol Fluconazol und dem neuen Benzimidazol EMC120B12 durchgeführt. Für weitere Erkenntnisse über das genaue Target soll der Gehalt der einzelnen Sterole von *C. albicans* über GC/MS analysiert werden. Veränderungen im Sterolmuster und gegebenenfalls akkumulierenden Sterole oder Vorstufen sollen den Wirkungsmechanismus weiter charakterisieren und die Identifizierung der Zielenzyme von EMC120B12 in der Ergosterol-Biosynthese aufdecken. Welche Wirkung EMC120B12 auf den intrinsisch gegen Azole resistenten *C. krusei* hat, soll auf diese Weise ebenfalls in dieser Arbeit geklärt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Für die Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Chemikalien verwendet. Die Bezugsquelle ist angegeben. Alle Substanzen waren von analysereiner Qualität und das verwendete Wasser voll entsalzt und doppelt destilliert. Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sarstedt AG & Co, Eppendorf AG, Hamburg; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

Versuchsrelevante Chemikalien und deren Bezugsquelle, sowie spezielle Verbrauchsmaterialien sind unter der entsprechenden Methode angegeben.

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin B (Stock 250 µg/ml)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bacto Peptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cholestan (10 mg/l)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cy3 ddUTP	Perker Elmer, Boston, USA
Cy5 ddUTP	Perker Elmer, Boston, USA
D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dihydrocholesterol (Cholestan)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Deutschland
dNTPS	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EMC120B12 (50 mM in DMSO)	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fluconazol (Pulver)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mikrobiologisch reines Wasser	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MOPS Pufferan 99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MSTFA ( <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochlorid-Lsg.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nocodazol, (Pulver)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).
PSA (Primäres Sekundäres Amin)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
RNaseZAP	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640 Pulvermedium ohne NaHCO <sub>3</sub> , mit L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SSC (Saline Natrium-Citrat)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
TBME (Tert.-Butylmethylether)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
TSMI (Trimethylsilylimidazol)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2 Kit-Systeme, Enzyme und Antikörper

Die RNA-Isolierung, die RNA-Konzentrationsmessung und die Transkription eben solcher in cDNA wurden mit Hilfe der in Tabelle 3 aufgeführten Kit-Systeme durchgeführt. Zudem sind alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Kits, Enzyme und Antikörper in dieser Tabelle aufgelistet.



**Tabelle 3: Verwendete Kits, Enzyme und Antikörper**

<b>Kit, Enzym, Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent RNA 6.000 Nano	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
anti-tubulin antibody YOL1/34	Abcam plc, Cambridge, UK
DyLight 488 labeled 2 <sup>nd</sup> antibodies	Abcam plc, Cambridge, UK
LabelStar-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTec Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy midikit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Zymolyase	Fermentas GmbH, St.Leon-Roth, Deutschland

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien dieser Arbeit sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Braunglasvial / Autosampler-Vials 1,5 ml	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Einmalküvetten aus Polystyrol (1,5ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben (100ml)	Schott DURAN, Deutschland
Epoxy-Slides	Schott Nexterion, Erlangen, Deutschland
Falcon (15ml, 50ml) Cellstar® (sterile)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## 2.4 Geräte und Software

Alle Geräte sowie Software, welche für die Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor benötigt wurden, sind unter Angabe der genauen Typbezeichnung und des Herstellers in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software**

<b>Gerät</b>	<b>Typbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Systemec VE-95	Systemec GmbH Wettenberg, Deutschland
Bilddokumentations-Software	AxioVision	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Bioanalyser	Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies Waldbronn, Deutschland
Brutschrank	BM 200	Heraeus Instruments GmbH Hanau, Deutschland
Einkanalpipetten	Mechanisch	VWR, Darmstadt, Deutschland
Eismaschine	ZBE150/B100)	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Gaschromatograph	GC 3800	Varian, Darmstadt, Deutschland
Gefrierschrank (- 80°C)	Herafreeze Basic HFU 686	Thermo scientific, Waltham Massachusetts, USA
Gefrierschrank (- 25°C)	Comfort NoFrost	Liebherr GmbH Biberach, Deutschland
GenePix 4300A Scanner		MDS Analytical Technologies GmbH, Ismaning
Heizblock	Neo Block 1 2-2503	neoLab Migge GmbH Heidelberg, Deutschland
Heizschrank	HERA THERM Oven	Thermo scientific, Waltham Massachusetts, USA
Inkubatoren	HERA THERM Incubator	Thermo scientific, Waltham Massachusetts, USA
	Multitron Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Kamera	AxioCam HCC	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
LightCycler	LightCycler®480	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
Magnetrührer		IKA Labortechnik Staufen, Deutschland
Mehrfachdispenser	Handy Step Electronic	BRAND GmbH Wertheim, Deutschland
Mehrkanalpipette	Transferpette®-8 electronic 10-200 µl	BRAND GmbH Wertheim, Deutschland
Microarray-Spotter	MicroGridII spotter MG610	Bio Robotics, Cambridge UK
Microplate Reader	Synergy 2	BioTek Instruments GmbH Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikroskope	Axiovert 25 Axiovert 200 M AxioCam MRm Mikroskop HBO50	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland  Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Multifunktionsscanner	Expression 1680 Pro	EPSON GmbH, Meerbusch, Deutschland
pH-Meter	SevenEasy	Mettler-Toledo AG Schwerzenbach, Schweiz
Photometer	Jasco Photometer V-630	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß- Umstadt
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH Fernwald, Deutschland
Plattenreader	Synergy 2	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Reinluftwerkbank	MSC - Advantage	Thermo scientific, Waltham Massachusetts, USA
Retschmühle	Retsch Mill MM 200	Retsch GmbH, Haan, Deutschland

Scanner	Fujifilm FLA 5100	Raytest, Straubenhardt
Schüttelinkubator	innova® 44, Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Sicherheitswerkbank	HeraSafe, Typ HS18	Heraus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Thermo scientific, Waltham, USA
Spülmaschine	Professional G 7883	Miele & Cie. KG Gütersloh, Deutschland
Stickstofftank	MVE Chart 510 F	German-Cryo GmbH, Jüchen, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Tischzentrifuge	Galaxy Ministar	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallwasserbad	Sonorex RK100H	Bandelin electronic Berlin, Deutschland
Vakuumzentrifuge	SpeedVac Concentrator Savant	Thermo scientific, Waltham
Vortexer	Vortex Mixer	neoLab Migge GmbH Heidelberg, Deutschland; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waagen	Feinwaage A120S Grobwaage L2200S+	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Biofuge Fresco 17 Heraeus Multifuge 3S-R Heraeus Megafuge 10	Thermo scientific, Waltham Massachusetts, USA
Tischzentrifuge	Galaxy Ministar	VWR, Darmstadt, Deutschland

## 2.5 Verwendete *Candida*-Stämme und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten *Candida*-Stämme waren sowohl klinische Isolate aus der Stammsammlung aus S. Rupps-Labor am Fraunhofer IGB und aus K. Schröppels Labor. Alle Stämme sind unter Angabe der Stamm-Bezeichnung, des Genotyps und des Donors (soweit bekannt) in der Publikation Burger-Kentischer et al. 2011 veröffentlicht.

Für die Charakterisierung der Wirkungsweise und des genauen Wirkortes von EMC120B12 und die Sterolanalysen wurden nach ersten Versuchen in dieser Arbeit folgende Stämme aus der Sammlung ausgewählt: Der auf Fluconazol und EMC120B12 sensitive *C. albicans* Wildtyp SC5314 (MHK Fluconazol: 1 µg/ml, MHK EMC120B12) und das auf Azole resistente *C. albicans*-Isolat Can741 (MHK Fluconazol: 32 µg/ml, MHK EMC120B12: 8 µg/ml), sowie *C. krusei* Wildtyp-Stämme, welche, bedingt durch die intrinsische Resistenz gegen Azole, eine hohe Resistenz gegen Fluconazol zeigten, aber in den Versuchen in dieser Arbeit auf EMC120B12 sensitiv reagierten (MHK Fluconazol: über 32 µg/ml, MHK EMC120B12: 1 µg/ml).

## 2.6 Anzucht von *Candida*-Stämmen

Die Hefestämme wurden über Nacht in YPD (10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g/l Glucose) oder auf Agar-Platten (2 % Bacto-Agar, Difco) bei 30°C kultiviert.

Für die Mikroarray-Analysen wurde für die Induktion der Hyphenbildung das Zellkulturmedium DMEM (Gibco Life Technologies, Darmstadt) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) verwendet und bei 37 °C inkubiert.

## 2.7 Kryokonservierung der verwendeten *Candida*-Stämme

Für die langfristige Lagerung wurden die verwendeten *Candida*-Stämme kryokonserviert. Dafür wurden 2 ml einer *Candida* Übernacht-Kultur bei ca. 4000 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl YPD resuspendiert und die Zellsuspension mit 500 µl Glycerin (80 %) vermengt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C in 1 ml Kryoröhrchen.

## 2.8 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten mit humanen Zellen erfolgten unter einer sterilen Sicherheitswerkbank, um Kontaminationen in den Kulturen zu vermeiden. Es wurden

außerdem ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien und Lösungen verwendet und alle Arbeitsflächen und alle Gegenstände, die unter Sicherheitswerkbank Einsatz fanden, wurden zuvor mit 70 % Ethanol desinfiziert.

### 2.8.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die speziell für das zellbiologische Arbeiten verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6 aufgeführt. In Tabelle 7 sind die für die Zellkultur verwendeten Chemikalien aufgelistet.

**Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien für zellbiologische Arbeiten**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
MultiWell™ 24 Well; Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Thin Certs-TC Einsätze, 24 Well, membrane: 0,4 µm, transparent (Insert)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Tissue Culture Flask (Zellkulturflaschen, T75, T175)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Inkubator Zellkultur HERA cell 240 bzw. 150 bzw. 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserbad, Typ 1008	GFL, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Cell Counter CASY	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Megafuge 1.OR	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

**Tabelle 7: Chemikalien für zellbiologische Arbeiten**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumbicarbonat 7,5% (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (1M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gentamicin (10 mg/ml)	Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt
NaOH (10M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen Typ I isoliert aus Rattenschwänzen	Fraunhofer IGB
Natriumpyruvat (100 mM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin B (250 µg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Casyton	Roche, Mannheim, Deutschland

## 2.8.2 Supplementierte Zellkulturmedien und Puffer

Die für die zellbiologischen Arbeiten benötigten Medien sind im Folgenden aufgeführt. Alle Medien und Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Life Technologies™, Karlsruhe bezogen.

### D-MEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium):

High Glucose, 1 x, flüssig (Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt). Vor Gebrauch wurde mit 50 ml FCS, Gentamicin (Endkonzentration im Medium 1 %) und Natrium-Pyruvat (Endkonzentration: 1 mM) supplementiert.

### RPMI 1640 /Gibco):

Vor Gebrauch wurde mit 50 ml FCS, Gentamicin (Endkonzentration im Medium 1 %) und Natrium-Pyruvat (Endkonzentration 1 mM) und 2 mM L-Glutamin supplementiert.

### Trypsin/EDTA

Hersteller: Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Konzentration: 0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA, 4 Na.

### FCS (Fetal Calf Serum)

Hersteller: Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt. Hitzeinaktivierung des Komplementsystems und Aliquotierung: Das gefrorene FCS wird bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wird das FCS für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert und dabei alle 5 Minute geschüttelt. Es werden 50 ml Aliquots bei –20 °C gelagert.

### Einfriermedium

Als Einfriermedium wurde DMEM unter Zugabe von FCS (Endkonzentration 10 %) und 5 % DMSO verwendet. Es wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Gefriermedium eingefroren. Die Zellen wurden zuerst bei –80 °C in einer Styropor- bzw. Isopropanolbox eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

10x PBS<sup>-</sup>-Lösung (Phosphate buffered Saline mit EDTA):

	Endkonzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhydr.	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	8,1 mM
EDTA	1 mM

Herstellung: Alle Salze werden in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wird der pH-Wert auf 7,2 mit EDTA aus einer 0,5 M Stammlösung eingestellt. Nach Auffüllen auf das vorgesehene Endvolumen wird das 10x PBS<sup>-</sup> autoklaviert.

Gelificant Solution:

4,5 ml 2x D-MEM (5,4 g Pulver in 103 ml ddH<sub>2</sub>O, steril filtriert), 650 µl NaHCO<sub>3</sub> (7,5 %), 500 µl HEPES (1M), 1350 µl FCS, 67 µl Gentamicin, 130 µl NaOH (10 M). Die Gelificant Solution konnte bei 4 °C eine Woche gelagert werden.

### **2.8.3 Kultivierung der verwendeten humanen Zelllinien**

Die humanen Zelllinien A431 (DSMZ no.: ACC 9), Caco-2 (DSMZ no.: ACC 169), HeLa (ATCC catalog no. CCL-2) und TR146 (Imperial Cancer Research Technology Institut) wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (T75, Firma Sarstedt) in einem Gesamtvolumen von 10 ml des entsprechenden Mediums kultiviert. Eine Übersicht der Zelllinien ist in Tabelle 8 zu finden. Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Zelldichte von ca. 80 % wurden die Zellen kurz vor Erreichen einer konfluenten Zellschicht in einem Verhältnis von 1:5 passagiert. Für diese Subkultivierung wurde der Zellrasen zunächst mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und dann mit 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für ungefähr 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte nur solange, bis die Zellen sich gerade abgelöst hatten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml des entsprechenden supplementierten Zellkultur-Mediums gestoppt. Die Anzahl der Zellen wurde mit einem elektronischen Zählgerät dem Cell Counter CASY<sup>®</sup>, einem vollautomatischen Zellanalysegerät (Modell TTC) der Firma Roche, Mannheim, bestimmt. Nach einer Zentrifugation von 3 Minuten mit 1700 x g bei Raumtemperatur wurden die Zellen in supplementiertes Zellkulturmedium aufgenommen und auf neue Flaschen verteilt.



Die verwendeten Medien und Puffer sind unter 2.8.2 Supplementierte Zellkulturmedien und Puffer aufgeführt. Die Humanzellen Caco-2, A431 und TR146 wurden in supplementiertem DMEM und die HeLa-Zellen in RPMI1640-Medium kultiviert.

**Tabelle 8: Verwendete humane Zelllinien**

<b>Humane Zelllinien</b>	<b>Bezugsquelle bzw. Zelltyp</b>
Caco-2 (Darmschleimhautzelllinie)	ATCC HTB-37; humane colorectale Karzinomzelllinie
TR146 (Mundschleimhautzelllinie)	Humane Karzinomzelllinie der Wangenschleimhaut
A431 (Vaginalschleimhautzelllinie)	Humane vulvovaginale Karzinomzelllinie
HeLa (Epithelzelllinie Zervixkarzinom)	Human cervix carcinoma cells, ATCC catalog no. CCL-2

#### **2.8.4 Kryokonservierung und Auftauen der Humanzellen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jeweils 1-3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen (Sarstedt) überführt, zunächst bei -80 °C eingefroren und später in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen der Humanzellen wurde das Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und direkt bei 37 °C im Wasserbad nur so lange erwärmt, bis noch ein kleiner gefrorener Kern vorhanden war. Um das DMSO zu entfernen, wurde zu der Zellsuspension 5 ml des jeweiligen Mediums (DMEM oder RPMI1640) zugegeben, vorsichtig gemischt und bei 300 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### **2.8.5 Invasionsassay in komplexen *in vitro* 3D-Hautmodellen**

Der Aufbau der komplexen *in vitro* 3D-Hautmodelle erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll von Dieterich et al., 2002. Verwendet wurde die Zelllinie Caco-2. Für die Versuche mit *C. glabrata* (Can455; Wildtyp) wurde neben der Zelllinie Caco-2 auch die Zelllinie TR146 im 3D-Hautmodell verwendet. Alle Lösungen und sonstige Gebrauchsmaterialien für die Histologie sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Histologie**

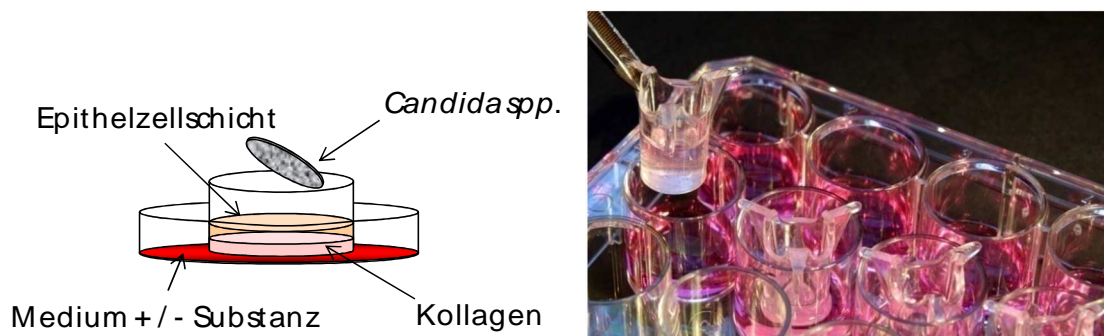
<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser (24x60mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einbettautomat Citadel 1000	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Filterpapier	Labonord, VWR international, Deutschland
Heiz-(Streck)platte Medax	Störk-Tronic, Stuttgart, Deutschland
Inkubator (60 °C), Function Line	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Kühlplatte	Bavimed, Birkenau, Deutschland
Microtom RM 2145	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektträger (unbeschichtet, 76x26mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Plastikkassetten	Labonord, VWR international, Deutschland
Streckbad / Wasserbad Medax	Störk-Tronic, Stuttgart, Deutschland

**Tabelle 10: Chemikalien für die Histologie**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Bouin´s Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Mayers Hämatoxylin (Hämalaunlösung sauer nach Mayer)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogensulfidlösung (NaHSO <sub>3</sub> , 37,5 %, in Wasser)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin, Sasolwax 5403	Sasol Wax GmbH, Hamburg, Deutschland
Periodsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Polychromlösung (Fluka, 81320)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti®-Histokitt (Einschlussmittel)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roticlear® für die Histologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl, 32 %, p.a.)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schiff´s Reagens auf Aldehyd (Fluka, 84655)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

### 2.8.5.1 Aufbau der Kollagenmatrix und Aussaat der Humanzellen

Die humanen Zellen wurden auf eine Kollagenmatrix ausgesät. Zur Aufbau dieser Matrix wurde Gelificant Solution im richtigen Verhältnis mit dem aus Rattenschwänzen gewonnenem Kollagen (Typ I) gemischt. Das optimale Verhältnis bewirkte eine Pinkfärbung des Kollagens. Bei einer Gelbfärbung war der Anteil an Gelificant Solution zu gering. Die Inserts (Porengröße Membran 0,4  $\mu\text{m}$ ) wurden in eine 24 Well Zellkulturplatte eingesetzt. In jedes Insert wurden 300  $\mu\text{l}$  vom Kollagenmix pipettiert und mindestens 30 Minuten bei 37 °C + 5 %  $\text{CO}_2$  bis zum Festwerden des Kollagens inkubiert. In jedes Wells der 24-Well-Platte wurden 500  $\mu\text{l}$  supplementiertes DMEM-Medium gegeben. Dies diente zur Versorgung des Epithelmodells im Insert mit Nährstoffen. In einigen Wells wurde dem Medium zudem EMC120B12 (Stocklösung: 50000  $\mu\text{M}$ , Konzentration im Versuch:  $\text{IC}_{50}$  von 0,4  $\mu\text{M}$ ) oder Amphotericin B (Stocklösung: 100  $\mu\text{g/ml}$ , Konzentration im Versuch: 0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) beigemischt. Im Anschluss wurden die Humanzellen auf der Kollagenmatrix ausgesät. Dazu wurden die Zellen wie bereits beschrieben abgelöst, gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM aufgenommen, so dass die Zellzahl der Suspension 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml entsprach. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden auf jedes Insert gegeben. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt und die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert. Dabei bildeten diese einen konfluenten Monolayer auf der Kollagenmatrix aus.



**Abbildung 7: Aufbau eines *in vitro* 3D-Hautmodells**

Links: Schematische Darstellung des Aufbaus eines *in vitro* 3D-Hautmodells (Verändert nach Burger-Kentischer et al., 2011). Rechts: Fotografie eines fertig aufgebauten *in vitro* 3D-Hautmodells dieser Arbeit.

Nachdem das Medium in den Wells durch Gentamicin-freies DMEM ersetzt wurde, erfolgte die Infektion. Dazu wurden *C. albicans* Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kulturen ( $\text{OD}_{600}$  1) in 10 ml ddH<sub>2</sub>O auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 verdünnt. Von

dieser Kultur wurden 10 µl auf jedes Insert mit Humanzellen pipettiert. Die Kontrollen ohne Pilz wurden nicht infiziert. Die Infektion erfolgte für 24 h bei 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>.

Für *C. glabrata* (Can455; Wildtyp) wurde ebenso die Zelllinie TR146 im 3D-Hautmodell verwendet. Ein Teil der Hautmodelle wurde mit hitzeinaktivierten *C. glabrata* Zellen infiziert. Die Inaktivierung erfolgte für 10 Minuten bei einer Temperatur 100 °C. Der Aufbau des in vitro Hautmodells ist in Abbildung 7 dargestellt.

### **2.8.5.2 Fixierung der 3D-Epithelmodelle und Einbettung in Paraffin**

24 Stunden nach der Infektion wurde das restliche Medium aus den Wells entfernt. Die Kollagengele wurden vorsichtig aus den Inserts herausgestochen und mit dem Monolayer aus Humanzellen nach unten in die leeren Wells gesetzt. Anschließend erfolgte die Fixierung durch einstündige Inkubation der Hautmodelle in Bouin's Lösung (Crosslinker). Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung entfernt. Die *in vitro* 3D-Epithelmodelle wurden mit einer Pinzette mit der Epithelseite nach unten in Plastikkassetten, die mit Filterpapier ausgelegt waren, überführt. Die Plastikkassetten mit den Proben wurden für mindestens 2 Stunden in einer Plastikwanne gefüllt mit Leitungswasser gewässert. Danach wurden die Proben in einem Gewebeeinbettautomat (Shandon Citadel™ 1000) dehydriert und in Paraffin eingebettet.

Der Ablauf der Einbettung ist im Folgenden aufgeführt:

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer in Stunden</b>
Leitungswasser I	1
Leitungswasser II	1
Ethanol 70%	1
Ethanol 90%	1
Ethanol 96%	1
Isopropanol I	1
Isopropanol II	1
Isopropanol/Xylol Verhältnis 1:1	1
Xylol I	1
Xylol II	1
Flüssig-Paraffin I	3
Flüssig-Paraffin II	3

### **2.8.5.3 Herstellung der Paraffin-Blöcke**

Nach abgeschlossener Einbettung der *in vitro* 3D-Epithelmodelle in Paraffin, wurden die Kassetten in eine mit flüssigem Paraffin gefüllte Glasküvette überführt. Diese wurde, um das Paraffin warm zu halten, auf eine Heizplatte gestellt. Die Epithelmodelle wurden aus den Kassetten herausgenommen und mit einem heißen Skalpell von unten nach oben, am Kollagen beginnend in Richtung Hautepithel, in zwei Hälften geschnitten. In ein mit Paraffin befülltes Edelstahlförmchen wurden die beiden Hälften des 3D-Epithelmodells mit der Schnittfläche nach unten mit Hilfe einer Pinzette auf den Boden des Edelstahlförmchens gestellt. Die Plastikkassette wurde nach Entfernung des Deckels ins noch flüssige Paraffin im Edelstahlförmchen gelegt. Die Aushärtung des Paraffins erfolgte im Kühlschrank. Danach konnten die Paraffinblöcke aus den Edelstahlförmchen gelöst werden.

### **2.8.5.4 Schneiden der Paraffinblöcke mit dem Rotationsmikrotom**

Die Paraffinblöcke wurden für ca. 20 Minuten auf einer Kühlplatte (-20 °C) vorgekühlt, um den Vorgang des Schneidens zu erleichtern und glatte Schnitte zu erzeugen. Die Proben wurden am Rotationsmikrotom (Leica RM 2145, Leica Instruments, Nussloch) in 3 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer Pinzette in ein 38 °C warmes Wasserbad überführt. Das Wasserbad diente als Streckbad zur Glättung kleiner Fältchen der Schnitte. Die geglätteten Schnitte (ca. 3-4 Stück pro Probe) wurden auf einen beschrifteten Objektträger überführt und zur Trocknung für mindestens 30 min auf eine Heizplatte (42 °C) gelegt.

### **2.8.5.5 Entparaffinisierung und P.A.S. (periodic acid Schiff) - Färbung**

Die Schnitte wurden nach der P.A.S.-Methode und der Methode von McManaus gefärbt. Für die Entparaffinisierung und Färbung wurden folgende Lösungen jedes Mal frisch angesetzt.

1 % Periodsäure:

2 g Periodsäure in 200 ml ddH<sub>2</sub>O

Sulfitwasser (Sodium Bisulfite Solution):

1000 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml HCl (1 M) + 60 ml 10 % NaHSO<sub>3</sub>

HCl 0,03 M:

30 ml HCl (1 M) + 970 ml ddH<sub>2</sub>O

Ablauf der P.A.S.-Färbung:

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
Roticlear I	10 Minuten
Roticlear II	3 Minuten
96 % Ethanol I	2 Minuten
96 % Ethanol II	2 Minuten
70 % Ethanol	2 Minuten
50 % Ethanol	2 Minuten
ddH <sub>2</sub> O	Spülen
1 % Periodsäure	5 Minuten
H <sub>2</sub> O	Spülen
Schiff´s Reagens	15 Minuten
Sulfitwasser	3 x 2 Minuten
ddH <sub>2</sub> O	10 Minuten
Mayers Hematoxylin	15 Sekunden
0,03 M HCl	1-2x dippen
warmes H <sub>2</sub> O	5 Minuten
50 % Ethanol	2 Minuten
70 % Ethanol	2 Minuten
96 % Ethanol	2 Minuten
Polychromatic staining solution EA50	1 Minute
96 % Ethanol	3 x dippen
100 % Ethanol	30 Sekunden
Isopropanol I	2 Minuten
Isopropanol II	2 Minuten

Bei der Färbung wurden Cellulose, Mucopolysaccharide, Muco- und Glycoproteine, Glycolipide, ungesättigte Fettsäuren und Phospholipide aus der Pilz-Zellwand magentarot gefärbt. Die Kerne der Epithelzellen erschienen blau und das Kollagen hellblau.

Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Konservierung der Schnitte wurde Roti®-Histokitt (Einschlussmittel) verwendet. Die Objektträger wurden zur Trocknung von Histokitt für mindestens 2 Stunden unter dem Abzug abgelegt und anschließend mit einer LD 40 x bzw. LD 63 x Vergrößerung mikroskopiert (Zeiss Axiovert M200).

## **2.9 Screening und Titration von Substanzen mit dem Activity-Selectivity-HTS Screening Assay (AS-HTS-Assay)**

Die verwendete Substanz-Bibliothek aus verschiedenen heterozyklischen Verbindungen wurde vom Projektpartner EMC microcollections synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Ebenso wurde die Synthese der EMC120B12-Derivate und einzelner Hit-Komponenten für ein Rescreening von EMC übernommen.

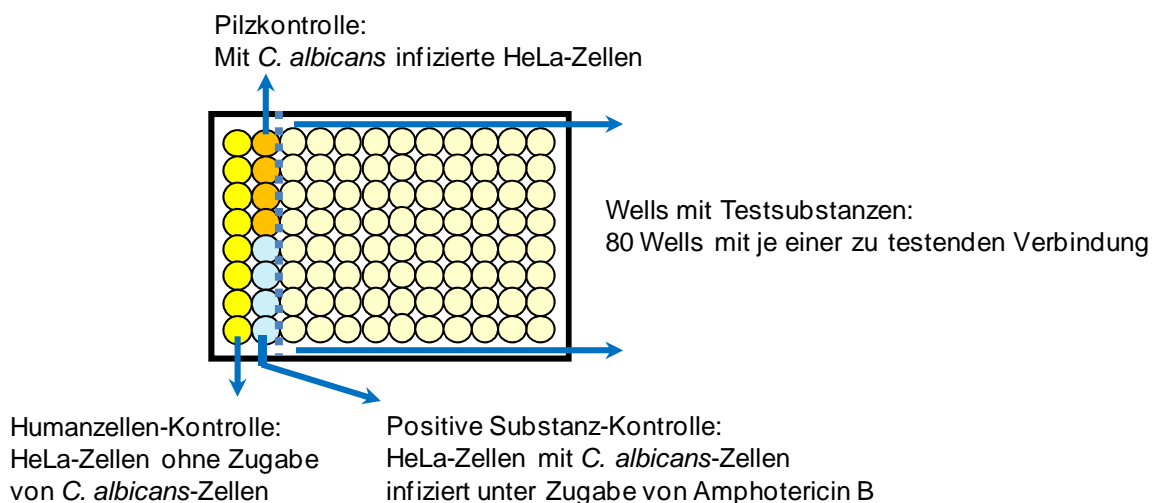
### **2.9.1 Screening einer Substanzbibliothek mit dem AS-HTS-Assay**

Der AS-HTS-Assay wurde wie unter Burger-Kentischer et al., 2011 beschrieben durchgeführt. Für die zellulären Assays wurden ausschließlich Zellkulturplatten aus klarem Polystyrol der Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen verwendet. Der Screening-Assay wurde in einer 96-Well-Zellkulturplatte wie folgt durchgeführt: In den Wells mit den zu testenden Substanzen wurden zunächst 100 µl des Zellkulturmediums (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Glutamin) vorgelegt. Pro Well wurden anschließend 10000 HeLa-Zellen ausgesät. Dazu wurden 50 µl einer Suspension in Zellkulturmedium mit 200000 HeLa-Zellen in jedes Well gegeben. Zu den Humanzellen wurden anschließend 50 *C. albicans*-Zellen (SC5314, Can14) zugegeben. Hierfür wurde eine exponentielle Pilzkultur auf 1000 Zellen / ml mit nicht supplementierten RPMI1640 verdünnt. Von dieser Stocklösung wurden je Well 50 µl in die Wells pipettiert.

Die lyophilisierten Testsubstanzen wurden ebenfalls im 96-Well-Format geliefert und mit DMSO gelöst. Es wurde ein Stock von 40 µM hergestellt. In 80 Wells der Platten war je eine Substanz vorgelegt, so dass pro Screening-Assay-Platte 80 Verbindungen auf ihre antimykotische Aktivität getestet werden konnten. 100 µl der Stocklösungen

der Substanzen wurden anschließend einzeln in die Wells der 96-Well-Zellkulturplatte mit den bereits vorgelegten HeLa-Zellen und *C. albicans*-Zellen gegeben. Die Endkonzentration der gelösten Substanzen im Assay betrug 20 µM. So konnte in jedem der 80 Wells eine Substanz gleichzeitig mit Humanzellen und *Candida*-Zellen getestet werden.

In einer Spalte auf jeder Platte wurden zudem als Humanzellen-Kontrolle nur HeLa-Zellen in Medium ausgesät (150 µl Medium + 50 µl Humanzellen-Stock). Es wurden ebenso 4 Wells nur mit *C. albicans*-Zellen in Medium als Pilzkontrolle (150 µl-Medium + 50 µl *C. albicans*-Stock) und 4 Wells mit Amphotericin B (198 µl Medium + 2 µl eines Stocks mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml) als positive antimykotische Substanz-Kontrolle mitgeführt. Eine schematische Darstellung einer Screening-Platte des AS-HTS-Assays ist unter Abbildung 8 aufgeführt.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Screening-Platte des AS-HTS-Assays**

Das Endvolumen in den Wells betrug 200 µl. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 Tage inkubiert. Die Zellen und Wells wurden an Tag 3 und Tag 5 mikroskopisch (Lichtmikroskop Vergrößerung 10 x und 20 x) auf Auffälligkeiten untersucht. Zudem wurde die Farbe des Mediums per Auge geprüft.

Nach fünf Tagen Inkubation wurde das Medium aus den Zellen abgesaugt und es wurde eine Fluoreszindiacetat-Lösung (FDA) in alle Wells gegeben. Es folgte eine photometrische Auswertung der Vitalität der Humanzellen in den Wells. Lebende Humanzellen setzten das Fluoreszindiacetat in messbares Fluoreszin um. So konnten die vitalen HeLa-Zellen bestimmt werden. Die Fluoreszenz in den Wells konnte mit der antimykotischen Aktivität der Testsubstanzen korreliert und somit Hits im Screening



bestimmt werden. Die Auswertung der Wirkstoffplatten erfolgte durch Berechnung der Fluoreszenzstärke im Vergleich zu den Kontrollen.

### **2.9.2 Titration von Hit-Substanzen mit dem AS-HTS-Assay und Bestimmung des IC<sub>50</sub> und CC<sub>50</sub>**

Der IC<sub>50</sub> (half inhibitory concentration) und der CC<sub>50</sub> (half cytotoxic concentration) auffälliger Substanzen (antimykotisch und zytotoxisch) des Screenings wurden über eine Konzentrationsreihe der Substanz bestimmt. Hierfür konnte ebenfalls der AS-HTS-Assay in einem leicht abgewandelten Pipettierschema eingesetzt werden. Pro Reihe wurde eine Substanz titriert. Die im Abschnitt zuvor beschriebenen Kontrollen wurden wieder mitgeführt und umfassten jeweils eine Spalte auf der Platte. Über eine 1:1-Verdünnung pro Well konnten so 10 verschiedene Konzentrationen einer Substanz getestet werden. Die Inkubation der Platten erfolgte wie für den AS-HTS-Assay beschrieben. Ebenso wurde die Auswertung wie bereits beschrieben über eine photometrische Messung von Fluoreszin und damit der Bestimmung der vitalen HeLa-Zellen ausgeführt.

### **2.10 Adaption des AS-HTS-Assays an weitere *Candida* spp.**

Zur Adaption des AS-HTS-Assays an weitere *Candida*-Stämme und zur Ermittlung der optimalen Zellzahl dieser Stämme für das Screening wurde eine modifizierte Variante des AS-HTS-Assay eingesetzt. In dieser Versuchsanordnung wurde ohne Zusatz von Testsubstanz gearbeitet. Getestet wurden Wildtypen von *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* und *Candida dubliniensis* (Ursprung Stammsammlung S. Rupps-Labor, Fraunhofer IGB). Die Zugabe der Pilzzellen erfolgte beginnend mit 50 Zellen pro Well in 10er Potenzen steigender Anzahl. Als Kontrollstamm wurde *C. albicans* verwendet. Zudem wurde als Kontrolle eine Spalte Humanzellen ohne Infektion mit *Candida*-Zellen mitgeführt und eine Spalte mit Amphotericin B. Die Inkubation der Platten erfolgte unter AS-HTS-Assay-Bedingungen. Die Auswertung wurde, wie für den AS-HTS-Assay beschrieben, über die Zugabe von Fluoreszindiacetat durchgeführt. Ein Teil der HeLa-Zellen der Humanzellen-Kontrolle wurde durch Zugabe von Triton X als Kontrolle und Vergleichspunkt vor der FDA-Zugabe und Fluoreszenzmessung abgetötet.

## 2.11 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von EMC120B12 und Fluconazol

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von EMC120B12 und Fluconazol wurde das Standard-Protokoll der EUCAST Referenz-Methode EDef 7.1 (Arendrup et al., 2012; EUCAST, 2008) leicht abgeändert verwendet.

Hiermit wurde die Empfindlichkeit der in dieser Arbeit verwendeter Hefe-Stämme gegen die eingesetzten Antimykotika und EMC120B12 getestet.

### RPMI1640 nach EUCAST:

10,4 g RPMI1640, 34,53 g MOPS, 18 g Glucose mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen.

Mit 10 M NaOH wurde das Medium auf einen pH von 7 eingestellt, erst dann wird auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Im Gegensatz zum EUCAST-Protokoll wurden in dieser Arbeit die Stämme zur Anzucht vor der Bestimmung des MHK-Wertes über Nacht in YPD inkubiert am darauffolgenden Morgen die optische Dichte bestimmt und darüber die korrekte Zellzahl berechnet. Eine OD von 1 entsprach in diesem Fall für *C. albicans* und *C. tropicalis* jeweils  $3 \times 10^7$  Zellen / ml und für *C. krusei*  $1 \times 10^8$  Zellen/ml. Diese Änderung des Protokolls hatte keine Auswirkung auf den MHK-Wert im folgenden Test. Dies wurde zuvor durch Tests belegt (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren wurde nach dem EUCAST-Protokoll ohne Änderungen verfahren.

Die *Candida*-Zellen wurden in frischem RPMI-Medium (RPMI 1640 nach EUCAST) auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Daraufhin wurden die Antimykotika und EMC120B12 auf die höchste einzusetzende Konzentration in RPMI angesetzt. EMC120B12 (50 mM Stocklösung) wurde in einer Konzentrationsreihe von 32 µg/ml bis 0,03125 µg/ml in jeweils 1:1 Verdünnungsschritten getestet. Der Wirkstoff Fluconazol (Stocklösung 256 mg/ml) wurde in einer Konzentrationsreihe von 128 µg/ml - 0,125 µg/ml in jeweils 1:1-Verdünnungsschritten im Test verwendet. Die Endkonzentration der Zellen betrug  $1 \times 10^4$  Zellen/Well. Der EUCAST-Test wurde 96-Well-Format pipettiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 200 µl. Jede 96-Well-Platte wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Reihe 1: Wachstumskontrolle Pilz, ohne Zugabe von wachstumshemmenden Substanzen. Reihe 2–12: Abnehmende Konzentration der Testsubstanz in einer 1:1 Verdünnung pro Well.

Die EUCAST-Platten wurden bei 35 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Wachstum der Hefezellen durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm im Synergy 2 Plattenreader bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden in Diagrammen dargestellt, anhand derer die MHK-Werte ablesbar waren. Der MHK-Wert wurde als die niedrigste Konzentration einer Substanz definiert, die das Wachstum eines Pilzes innerhalb eines bestimmten Zeitraums mehr als 50 % im Vergleich zu einer Probe ohne Testsubstanz inhibiert.

## 2.12 Immunfluoreszenz von *C. albicans* Tubulin

*C. albicans* Tubulin wurde durch Immunfluoreszenz-Aufnahmen sichtbar gemacht. Die Antikörperfärbung des Tubulin in *C. albicans*-Zellen wurde nach einem abgeänderten Protokoll von Kilmartin und Adams, 1984 durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Lösungen für diesen Versuch sind im Folgenden aufgeführt:

### Sorbitol-Puffer

1,2 M Sorbitol in 0,12 M  $K_2HPO_4$  / 0,033 M citric acid (pH 5,9)

### Phosphat-Puffer

0,1m M  $Na_2HPO_4$

### Waschpuffer

1,2 M Sorbitol in 0,12 M  $K_2HPO_4$  / 0,033 M Citronensäure (pH 5,9)

### 3,7 % Formaldehyd

37 % Stock-Lösung Formaldehyd mit 1x PBS 1:10 verdünnen

Die *Candida*-Zellen wurden aus einer Übernachtskultur mit einer  $OD_{600} = 0,2$  angeimpft und bis zum exponentiellen Wachstum und einer  $OD_{600}$  von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Testsubstanzen Fluconazol, EMC120B12 und Nocodazol in 100 ml der exponentiellen Kultur in folgenden Konzentrationen zugegeben: Nocodazol 7,5 µg/ml, Fluconazol 0,5 µg/ml und EMC120B12 0,1 µg/ml. Zudem wurde eine Kontrolle ohne antimykotische Substanz mitgeführt. Die Zellen wurden drei Stunden lang mit den Substanzen inkubiert und nach dieser Zeit durch Zentrifugation pelletiert.

Die Zellpellets wurden mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Nach 25 minütiger Inkubation der Zellen folgten weitere Waschschrirte. Es wurde drei Mal mit Phosphat-Puffer gewaschen, einmal mit Sorbitol-Puffer und die fixierten Zellen wurden anschließend in 1 ml Sorbitol-Puffer aufgenommen. Die resuspendierten Zellen konnten so bis zu eine Woche bei 4 °C gelagert werden. Der nächste Schritt war der Verdau der Pilzzellwände mittels Zymolyase. Der frisch hergestellte Zymolyase-Stock (10 µg/ml) wurde in einer 1:100-Verdünnung für den Verdau der Proben verwendet. Pro Probe wurden 200 µl der Verdünnung benötigt. Zudem wurde zu jedem Ansatz Zymolyase-Puffer zugegeben (2 ml 0,15 M Tris-HCl pH 7,5 + 25 µl β-Mercaptoethanol). Jede Probe wurde bei 37 °C in einer Zeitreihe von 40, 50, 60 und 70 Minuten verdaut. So konnte der richtige Zeitpunkt des Verdaus der Zellwände abgepasst werden. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Sorbitol-Puffer gewaschen und das Tubulin in den Zellen mit einem monoklonalen Anti-Tubulin-alpha-Antikörper (YOL1/34 IgG2a, WAK Chemie Medical GmbH) und einem gelabelten sekundären Antikörper (Dylight 488 Goat Anti Rat IgG (H+L), Abcam) angefärbt. Beide Antikörper wurden in einem BSA-PBS-Puffer (0.5 g BSA in 50 ml PBS) verdünnt und nach je 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur ebenfalls mit diesem Puffer dreimal gewaschen. Neben Tubulin wurden in allen Proben auch die Nuklei mit DAPI (Invitrogen) als Kontrolle angefärbt. Die DAPI-Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die angefärbten Proben wurden anschließend in einer LD 63 x Vergrößerung mikroskopiert.

## 2.13 Transkriptionsanalysen von *C. albicans* SC5314 mittels gesamt-genomischen DNA Microarrays

### 2.13.1 Inkubation mit Wirkstoff und Probenahme

Um den Einfluss von EMC120B12 und Fluconazol auf *C. albicans* weiter aufzuklären, wurden ausgewählten *Candida*-Stämmen mit den Substanzen inkubiert und anschließend die Proben für eine Microarray-Analyse aufgearbeitet. Als Erstes wurden Übernacht-Kulturen der ausgewählten *Candida*-Stämme angeimpft. Die Kulturen wurden am nächsten Morgen in 150 ml YPD-Medium überimpft und in bis zur exponentiellen Wachstumsphase, entsprechend einer OD von etwa 0,8, bei 30 °C inkubiert. In Erlenmeyerkolben wurden je Ansatz 100 ml mit 10 % FCS supplementiertes RPMI 1640 vorbereitet. EMC120B12 oder Fluconazol wurde in den entsprechenden Endkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) in das Medium zugegeben. Die Kontrollen blieben unbehandelt.

Alle Ansätze wurden mit der exponentiellen *Candida*-Kultur so angeimpft, dass die OD zum Start der weiteren Inkubation 0,4 betrug. Es wurde für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturen für 3 Minuten bei 1200 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert. Mit einer Pipette wurden die Proben tropfenweise in mit flüssigem Stickstoff gefüllte 50 ml Falcons gegeben. Die so entstandenen kleinen Zellperlen wurden bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

### 2.13.2 RNA-Isolierung

Der Aufschluss der *Candida*-Zellen erfolgte mechanisch mit einer Retschmühle (Retsch, Haan, Deutschland). Die Behälter der Retschmühle und alle anderen Gegenstände wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Um ein Auftauen der Proben zu Vermeiden wurde während des Zellaufschlusses gegebenenfalls flüssiger Stickstoff zugegeben. Die Frequenz des Aufschlusses betrug 30 Hz für 2 Minuten. Bei Bedarf wurde die Prozedur wiederholt, bis die Zellperlen vollständig zu feinem Pulver zerrieben waren. Das Pulver wurde daraufhin unverzüglich in 15 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben, in denen bereits 4 ml RLT-Puffer (RNeasy Midi Kit) mit 40 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol vorgelegt waren. Alle hierbei eingesetzten Geräte und Materialien wurden zuvor in Natriumhypochloridlösung eingelegt, gründlich ab gespült und mit 70 %igem Ethanol gereinigt.

Die RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Midi Kits von Qiagen aufgereinigt. Dabei wurde nach dem Protokoll „*Purification of total RNA from yeast*“ gearbeitet und die Prozedur für „*Mechanical disruption of cells*“ befolgt. Ein DNase-Verdau erfolgte auf den Säulchen mit dem RNase-free DNase-Set von Qiagen (Hilden, Germany). Die isolierte RNA wurde mit einer Lithiumchlorid-Lösung gefällt. Hierzu wurden 500 µl 4 M LiCl-Lösung zu 500 µl RNA-Probe gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die RNA wurde anschließend dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen und das RNA-Pellet bei 37 °C für 5 Minuten getrocknet. Danach wurde die RNA in 50 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.13.3 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels einer Kapillar-Gelelektrophorese im Agilent 2100 Bioanalyzer. Es wurden RNA Nano 6000-Chips eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die RNA-Proben wurden zuvor jeweils 1:10 mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O verdünnt und davon 1 µl für die Analyse eingesetzt.

### **2.13.4 Reverse Transkription und Labeling der Proben**

25 µg der isolierten RNA wurden für die Reverse Transkription in cDNA und für das Labeling eingesetzt. Das maximale einsetzbare Volumen der RNA betrug 19 µl.

Die Reverse Transkription und das Labeling wurden mit dem LabelStar-Kit von Qiagen (Hilden, Germany) durchgeführt. Die Markierung erfolgte dabei mit Cy3-dCTPs oder Cy5-dCTPs. Alle Reaktionen wurden auf Eis und genau nach Protokoll des Kits durchgeführt.

Nach der Reversen Transkription wurden die Cy3- beziehungsweise Cy5-markierten Proben und die Referenz vereinigt, aufgereinigt und mit 30 µl Elution buffer des Kits eluiert. Bei Cy3-markierten Proben war die Referenz entsprechend mit Cy5 markiert. Ebenso war die Referenz einer Cy5-markierten Probe mit Cy3 markiert.

### **2.13.5 Drucken und Blocken der DNA-Microarrays**

Die gesamt-genomischen *C. albicans*-DNA-Microarrays wurden auf Epoxy-Slides (Schott Nexterion, Jena, Deutschland) mit dem Microgrid II robot von Biorobotics (DigiLab Inc., Holliston, USA) gedruckt. Es wurden 6400 Oligonukleotide (55-70 mer), gelöst in Spotting Puffer (3 x SSC, 1.5 M Betaine) im Duplikat verwendet. Zudem

wurden 10 Bakteriophagen Lambda-Oligonukleotide als DNA spezifische Kontrolle auf die Slides aufgebracht.

Die Oligonukleotide (Operon Biotechnologies Custom Array-Ready Longmers, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) zeigten weniger als 70 % Kreuzhybridisierung mit den Daten folgender Sequenzen: Humane Genomsequenz (BLAST Datenquelle: *C. albicans* Assembly 21, [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org) und Ensembl Human Transcripts [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Die Oligonukleotide wurden mit SMP3 Pins (Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA) auf die Slides gespottet. Im Anschluss wurden die Sonden, der in dieser Arbeit verwendeten Epoxy-Slides, auf der Oberfläche der Slides immobilisiert. Dazu wurden die Slides zunächst für 30 Minuten in einer Feuchtigkeitskammer (> 80 % Luftfeuchtigkeit) gelagert und anschließend bei 80 °C für 120 Minuten gebacken (Cabinet Dryer, Memmert GmbH). Die DNA-Arrays wurden bis zur Verwendung im Exsikkator unter Argon-Atmosphäre gelagert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurden die Mikroarrays vor der Hybridisierung wie folgt bei Raumtemperatur geblockt:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>
0,1 % Triton-X-100	5 Minuten
1 mM HCl	4 Minuten
100 mM KCl	10 Minuten
ddH <sub>2</sub> O	1 Minute
Blocking Solution	15 Minuten
ddH <sub>2</sub> O	1 Minute

Die Blocking Solution (1x Nexterion Blocking Solution, Schott, Jena, Germany) wurde zuvor im Wasserbad auf 65 °C erwärmt. Nach dem letzten Schritt wurden die Slides durch Zentrifugation (10000 x g, 3 Minuten) getrocknet und bis zur Hybridisierung im Dunkeln gelagert.

### **2.13.6 Hybridisierung und Scannen der DNA-Microarrays**

Alle Versuche erfolgten in drei biologischen Replikaten. Zudem wurden die Proben als dye swaps (Vertauschen der Marker) durchgeführt. Es wurden die Proben nach Behandlung mit EMC120B12, Nocodazol und Fluconazol sowie eine unbehandelte Kontrolle wie im Folgenden beschrieben hybridisiert.

Hybridisierungs-Ansatz:

30 µl cDNA Eluat

6,5 µl SDS (1 %)

13 µl 20 x SSC

15,5 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden bei 100 °C für 3 Minuten denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht für 16 – 20 Stunden bei 65 °C. Dazu wurden LifterSlips Hybridisierungs-Deckgläser (25 x 44 mm, VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die LifterSlips entfernt und die Arrays wie folgt gewaschen:

2x SSC, 0,2 % SDS für 1 Minute (Entfernung der LifterSlips)

2 x SSC, 0,2 % SDS für 10 Minuten

2 x SSC für 10 Minuten

0,2 x SSC für 10 Minuten

Danach wurden die DNA-Microarrays durch Zentrifugation (10000 x g, 3 Minuten) getrocknet bis zum Scannen im Dunkeln gelagert. Die Slides wurden im Genepix Microarray-Scanner 4300A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) gescannt (Auflösung 10 µm; PMT Einstellung: Auto-PMT). Die Bilder beider Kanäle wurden als 16-bit TIFF Datei gespeichert.

### **2.13.7 Datenanalyse der DNA-Microarrays**

Zur Datenanalyse wurde ein gal-file entwickelt. Dazu wurde die TAS Application Suite software Version 2.7.1.18 von Genomic Solutions (Huntingdon, UK) verwendet. Zum Scannen der Slides wurde die GenePix Pro-Software Version 7.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) eingesetzt. Die Rohdaten wurden mittels der Software R (V. 2.10.1), dem Limma-Paket (V. 3.2.1) und dem statmod-Paket (V. 1.4.2) ausgewertet (Limma: Smyth GK. 2005, R: R: A language and environment for statistical computing. 2009). Zur weiteren Verarbeitung der Daten wurde die empirische Bayes-Methode und Smyth's empirische Bayes-Ansatz verwendet. Es wurde wie in Keller et al., 2015 beschrieben vorgegangen. Diese Methoden wurden eingesetzt, um Informationen über die Gene zu erhalten und die Analyse auch mit einer kleinen Anzahl von Arrays



pro Experiment stabil zu halten (Smyth, 2005; Smyth, 2004; Smyth et al., 2005). Die Korrektur des Hintergrunds wurde mit normexp (normal exponential model) mit einem Offset von 50 durchgeführt (Ritchie et al., 2007). Die Daten wurden wie unter Smyth und Speed, 2003 beschrieben normalisiert. Spots, die bei der Bildauswertung als nicht gefunden galten, wurden im Weiteren ignoriert. Es wurde zudem ein multipler Hypothesen-Test durchgeführt. Hierzu wurde nach der Methode von Benjamini und Hochberg vorgegangen (Benjamini und Hochberg, 1995). Der Quotient zwischen erwarteten falsch-positiven Genen und allen differenziell exprimierten Genen erlaubt es einen angepassten P-Wert (adjusted P value) zu berechnen. Dieser kann für Prognosen über die differentielle Gen-Expression verwendet werden. Gene wurden als differentiell exprimiert betrachtet, wenn der adjusted P value bei 0,05 lag, was mindestens einer 2-fachen Hoch- oder Runterregulierung der Gene entsprach. Die Microarray-Daten dieser Arbeit sind unter NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) hinterlegt. Die GEO Zugangsnummer ist die GSE64976.

## **2.14 Sterolanalytik von *Candida* spp. mittels GC/MS**

Die für die Sterolanalytik ausgewählten *Candida* spp. wurden mit jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen EMC120B12 und Fluconazol inkubiert. Zudem wurde Nocodazol in einer Konzentration von 7,5 µl/ml getestet. Unter 2.5 ist die Stammauswahl für die Sterolanalysen aufgeführt. Die unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen wurden in Abhängigkeit von den Resistenzcharakteristika des Testorganismus basierend auf den EUCAST-Daten ausgewählt. Die in den Proben enthaltenen Sterole wurden nach Extraktion aus den Zellen mittels Gaschromatographie, gekoppelt mit Ionenfallen-Massenspektrometrie (GC/MS), identifiziert. Der erste Schritt hierzu war das bereits existierende, von der LMU München bereitgestellte Protokoll für Sterolanalysen von S1-Organismen (hier *Saccharomyces cerevisiae*) zu testen und an *C. krusei* und den Hyphen-bildenden *C. albicans* zu adaptieren (Daten nicht gezeigt). Nach erfolgreicher Anpassung des Extraktionsprotokolls wurden die ausgewählten *Candida* spp. kultiviert, die Sterole extrahiert und mittels GC/MS analysiert.

### **2.14.1 Kultivierung der Zellen: Inkubation der Testorganismen unter Zusatz antimykotischer Substanzen**

Die *Candida*-Zellen wurden in 24 Well-Platten zusammen mit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert. Dabei wurde jeder Versuchsansatz mit 10 µl der Zellsuspension inokuliert. Die finale Zellzahl in den Zellkulturplatten betrug  $1 \times 10^7$  Zellen/Well. Es wurden Übernacht-Kulturen der Hefen in YPD angeimpft und am nächsten Morgen über Messung der optische Dichte (Jasco V-630, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) die Konzentrationen der Kulturen berechnet. Eine entsprechende Menge an Zellsuspension für die Endkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/Well wurde aus der Übernacht-Kultur entnommen, abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend in der entsprechenden Menge frischem RPMI1640-Medium wieder gelöst. EMC120B12, Fluconazol und Nocodazol wurden mit DMSO so verdünnt, dass letztendlich je maximal 10 µl daraus in das jeweilige Well gegeben werden mussten. Dann wurde mit RPMI1640 auf ein Endvolumen pro Well von 2 ml aufgefüllt. Die Zellkulturplatten wurden für 48h ohne Schütteln bei 30 °C inkubiert. Um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, wurde die Luftfeuchtigkeit im Inkubator erhöht. Die Analyse von allen Proben erfolgte immer in mindestens zwei biologischen Replikaten.

### **2.14.2 Sterolextraktion**

Zur Extraktion der Sterole wurden die in jedem Well am Plattenboden adhären Zellen im vorhandenen Medium in den Wells resuspendiert und anschließend bei 10000 x g 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Danach wurden jeweils 1 ml 2 M NaOH zu den Pellets gegeben. Die Suspension wurde für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Zellen voneinander zu lösen. Anschließend wurden die Suspensionen in 4 ml Glasvials mit Teflon-Septum überführt und fest verschlossen. Die Vials wurden 1 h bei 70 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen und die Sterol-Ester zu verseifen. Daraufhin wurden die Proben aus den Glasvials erneut in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Glasvials wurden mit 700 µl TBME (tert.-Butylmethylether, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gespült und diese Menge ebenfalls in die Reaktionsgefäße hinzugegeben. Zu jeder Probe wurden 50 µl Interner Standard (Cholestan, 10 mg/l, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) pipettiert. Alle Ansätze wurden 1 Minute lang kräftig geschüttelt und im Anschluss bei 10000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch

setzten sich 2 Phasen voneinander ab. Die obere Phase (TBME) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, welches bereits 40 mg ( $\pm 5$  mg) 7:1 Verreibung aus  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und PSA (primary secondary amine for dispersive solid phase extraction (dSPE), Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) enthielt. Die Extraktion mit 750  $\mu\text{l}$  TBME wurde wiederholt und daraufhin die vereinigten organischen Phasen mindestens 1 Minuten lang über der PSA-Verreibung geschüttelt. Dadurch wurden störende Zucker- und Fettsäurereste aus den Proben entfernt. Es wurde anschließend erneut für 5 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und jeweils 1 ml des Überstandes in ein 1,5 ml Braunglas-Autosampler-Vial überführt. Zur Trocknung der Proben wurden die Braunglasvials für 20 Minuten in einen SpeedVac Vakuumkonzentrator (Thermo scientific, Waltham Massachusetts, USA) gestellt. Die getrockneten Proben wurden fest verschlossen.

### 2.14.3 GC/MS-Messung

Vor Beginn der Analyse wurde der Rückstand in den Braunglasvials in 950  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen. Zudem wurden 50  $\mu\text{l}$  TSMI/MSTFA 1:9 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) zur Silylierung zugesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in das GC/MS-System injiziert. Alle weiteren Schritte wurden wie unter Müller et al., 2013 beschrieben durchgeführt. Für die Messungen wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Geräte und Programme verwendet.

**Tabelle 11: Für die GC/MS-Analyse verwendete Geräte und Software**

<b>Gerät / Programm</b>	<b>Informationen und Hersteller</b>
Autosampler	CombiPal from CTC Analytics (Zwingen, Schweiz)
GC	GC 3800 (Varian, Darmstadt, Deutschland)
Injektor	Split/splitless Injektor 1177 (Varian, Darmstadt, Deutschland)
MSD	Ion trap Saturn 2000 (Varian, Darmstadt, Deutschland)
Software	MS Workstation 6.9.SP 1 (Varian, Darmstadt, Deutschland)

#### 2.14.4 GC-Methode:

Die GC-Analysen wurden mit einer Varian VF-5 ms Kapillarsäule durchgeführt: Factor Four 5 ms 30 m plus EZ-Guard column x 0,25 mm x 0,25 µm (Fa. Varian, Darmstadt, DE). Das Trägergas war Helium 5,0 (99,9990 %) (Fa. Varian, Darmstadt, DE) und die Gesamtzeit pro Lauf betrug 18,2 Minuten.

Injektor: 250 °C  
 Injektionsvolumen: 1,0 µl, splitless (1,0 min)  
 Flussrate: 1,3 ml / Minute

Das Temperaturprogramm GC-Messung war wie folgt:

Zeit [min]	Gradient in [°C/min]	Temperatur [°C]
0	-	50
1,0-5,2	50	260
5,2 – 17,7	4	310
17,7 – 18,2	-	310

#### 2.14.5 MS-Methode:

Die MS-Messung lief in drei Segmenten ab. Im ersten Segment wurde für einen cut-off des Lösungsmittels das Massenspektrometer nach 9 Minuten eingeschalten.

Ionenfalle 200 °C  
 Manifold 50 °C  
 Transferline 270 °C

Scan Parameter Segment 1: Solvent delay/cut-off: 9 Minuten  
 Segment 2: 9 - 12 Minuten (full scan): 50 – 450 *m/z* (EI, 70 eV),  
 Segment 3: 12 -18,2 Minuten (full scan): 100 - 650 *m/z* (EI, 70 eV)

Ionisation EI: 70 eV

### 2.14.6 Auswertung der GC/MS-Daten

Die Sterole wurden als Trimethylsilyl (TMS)-Ether analysiert. Die Sterol-TMS-Ether wurden durch den Vergleich zu kommerziellen Standards (Cholestan) und zu synthetisierten Sterolen des Labors von Bracher (LMU München), der NIST™-Datenbank und Daten aus der Literatur, wie unter Müller et al., 2013 beschrieben, identifiziert.

Die aus den GC/MS-Messungen resultierenden Chromatogramme wurden auf das Vorhandensein charakteristischer akkumulierender Sterole untersucht. Diese geschah durch den Vergleich charakteristischer Massenspektren mit spezifischen relativen Retentionszeiten. Aus den Massenspektren der Sterole wurden je drei charakteristische Ionen als sogenannte *Qualifier Ions* ausgewählt, die zur Identifizierung der einzelnen Substanzen dienten. Diese *Qualifier Ions* entsprachen in den Zerfallsspektren der Sterole den drei größten Peaks. Der Basispeak war das Ion, welches dem Hauptfragment des Analyten entsprach. Dies wurde als Target-Ion oder Hauption bezeichnet. In Tabelle 12 sind Sterole aufgelistet, die in Zusammenhang mit der Ergosterol-Biosynthese stehen könnten. Das jeweilige Hauption des Sterols ist hervorgehoben.

## 2.15 Optimierung der Auswertungsmethodik der GC/MS-Daten zur Sterolanalyse

Um eine qualitativ korrekte Auswertung durchführen zu können, wurde mit Hilfe der Software MS Workstation 6.9.1 aus den Rohdaten jeweils die charakteristischen *Target Ions* je Sterol extrahiert und somit gewährleistet, dass die unterschiedlichen Peaks tatsächlich nur die relative Menge des einzelnen, akkumulierenden Sterols repräsentierten. Dadurch konnte auch eine semiquantitative Aussage getroffen werden.

**Tabelle 12: Sterole unter Angabe ihrer Molekülmasse, Qualifier Ionen\* und RRT**

\* Der Basispeak bzw. das Target-Ion ist unter den Qualifier Ions hervorgehoben. Jedem detektierten Sterol wurde eine Nummer zugeordnet. Diese ist in Klammern hinter dem Sterolnamen vermerkt.

Substanz/Sterol	Molekül- masse [g/mol]	Qualifier Ionen m/z	RRT
14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>7</b> )	572,9	377,2 <b>467,2</b> 557,3	1,36
14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>11</b> )	572,9	377,2 <b>467,2</b> 557,3	1,40
14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>5</b> )	572,9	377,2 <b>467,2</b> 557,2	1,49
14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	484,9	484,2 <b>379,3</b> 241,3	1,39
14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>6</b> )	570,9	570,3 465,2 <b>375,3</b>	1,39
14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>4</b> ) (Marker Sterol bei Inhibition der C14-Demethylase)	572,9	557,2 <b>467,2</b> 377,1	1,43
14-Methylfecosterol ( <b>3</b> ) (14-Methylergosta-8,24(28)- dien-3 $\beta$ -ol)	484,9	469,2 <b>379,3</b> 302,8	1,39

4,4,14-Trimethylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	512,9	497,2 <b>407,3</b> 241,2	1,48
4-Methylzymosterol (4-Methylcholesta-8-24-dien-3 $\beta$ -ol)	470,9	472 382 <b>255</b>	
5-Dehydroepisterol Ergosta-5,7,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	468,9	468,2 <b>363,3</b> 337,5	1,40
Cholestan (IS)	372,2	357,4 <b>217,1</b> 203,1	1,00
Dehydroergosterol Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol	466,8	376,4 <b>361,4</b> 251,4	1,36
Dihydroergosterol Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	470,9	470,3 343,3 <b>255,3</b>	1,35
Eburicol ( <b>2</b> ) (4,4,14-Trimethylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol)	512,9	<b>407,3</b> 408,3 241,4	1,51
Episterol (Ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol)	470,9	455,3 <b>343,3</b> 253,2	1,42
Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	470,9	380,3 <b>365,5</b> 339,4	1,40
Ergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol ( <b>9</b> )	468,7	343 255	1,44
Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol	472,9	<b>472,3</b> 367,5 255,4	1,42
Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	470,9	340,5 365,4 <b>339,5</b>	1,40

## Material und Methoden

Ergosta-8,14,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	468,9	<b>369,4</b> 425,3 453,2	1,36
Ergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol (14)	468,7	<b>343,2</b> 255,2 253,2	1,35
Ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol (15)	470,9	470,2 255,2 <b>229,2</b>	1,31
Ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol (8)	472,9	<b>472,2</b> 457,3 229,2	1,38
Ergosterol (13) Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol	468,9	378,5 <b>363,6</b> 337,5	1,34
Fecosterol Ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	470	470 455 <b>343</b>	
FF-MAS (12) 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol	482,9	<b>482,3</b> 397,3 377,4	1,46
Lanosterol (1) (Lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol)	498,9	498,4 <b>393,4</b> 241,3	1,45
Lichesterol (Ergosta-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol)	468,9	468,1 <b>363,2</b> 337,4	1,30
Obtusifoliol (4,14-Dimethylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol)	498,9	483,2 393,3 309,3	1,45
Squalen	410,7	<b>69,0</b> 80,9 95,0	0,94
T-MAS (4,4-Dimethylcholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol)	484,9	484,4 394,4 <b>379,4</b>	1,47



Zymosterol	456,8	456,2	1,32
(Cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol)		441,2	
		<b>351,5</b>	

## 2.16 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Analyse der Expression unterschiedlicher, meist an Resistenzmechanismen beteiligter Gene in verschiedenen behandelten *C. albicans*, wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

Die Inkubation mit Wirkstoff und die Probenahme, sowie die RNA-Isolierung der Proben erfolgten in gleicher Weise wie bereits für die Analyse mittels Microarrays beschrieben. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und die Qualitätskontrolle erfolgten ebenfalls, wie beschrieben, mittels einer Kapillar-Gelelektrophorese im Agilent 2100 Bioanalyze. 1  $\mu$ g der so gewonnenen Gesamt-RNS wurde unter Verwendung des QuantiTec Reverse Transcription Kit von Qiagen in cDNS transkribiert. Die cDNA diente als Matrize für die Real-Time PCR. Zusätzlich wurde die RNA dabei mit MS2-RNA gespikt, d.h. es wurde ein 3569 Basenpaare-langes RNA-Oligonukleotid aus einem MS2-Bakteriophagen zugegeben. Diese RNA diente als interne Referenz, da sie sich in ihrer Menge innerhalb der verschiedenen *Candida*-Proben nicht unterscheiden sollte. Spiken und Transkription der RNA erfolgten in einem Schritt. Abweichend vom Protokoll wurden alle Reaktionen in 1,5 facher Menge angesetzt. Des Weiteren wurde im ersten Reaktionsschritt 3  $\mu$ l RNase-freies Wasser durch 3  $\mu$ l der MS2-RNA-Lösung ersetzt und somit direkt mit transkribiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt nach der cDNA-Synthese  $1 \times 10^6$  Moleküle der MS2-RNA. Die verwendeten Primer der qRT-PCR wurden mit Hilfe des Roche online *Universal Probe Library (UPL) Assay Design Centers* RNase designt ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)) und von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) in HPLC reiner Qualität bezogen. Die Gen-spezifischen Primer sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die verwendeten Sonden stammten aus der human Universal ProbeLibrary von Roche (Mannheim, Deutschland). Alle verwendeten Primer-Sonden-Kombinationen sind ebenfalls in Tabelle 13 aufgelistet. Die qRT-PCR wurde in einem LightCycler® 480 der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) im 96-Well-Maßstab durchgeführt. Das LightCycler® 480 Probes Master Kit von Roche (Mannheim, Deutschland) wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Analyse der Daten wurde die LightCycler® Software von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Zur Auswertung der Daten der qRT-PCR wurde zunächst die PCR-Effizienz der einzelnen zu untersuchenden Gene bestimmt. Dazu wurde eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe erstellt, aus deren Steigung die qRT-PCR-Effizienz bestimmt werden konnte. Anschließend wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, bei der die Genexpression des Zielgens auf eine interne Kontrolle bezogen wurde. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die sogenannte CP-Methode (*Crossing Points*). Dabei wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP-Wert der viralen Referenz-DNA vom CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Nach dieser Normierung wurde vom CP-Wert der behandelten Proben der CP-Wert einer Kontrolle abgezogen. Als Kontrolle diente in diesem Fall jeweils die in allen Proben einheitliche Expression der MS2-DNA. Folglich konnte bei jeder Messung die Expression der Gene in den behandelten Proben auf die der unbehandelten Proben bezogen und miteinander verglichen werden. Für die Light Cycler-Messungen wurde folgendes Protokoll verwendet:

Schritt		Zeit	Temperatur	Temperaturanstieg
<b>1</b>	First Denaturation	5 min	95 °C	4.4 °C/sec
<b>2</b>	Denaturation	10 sec	95 °C	4.4 °C/sec
<b>3</b>	Annealing	15 sec	60 °C	2.2 °C/sec
<b>4</b>	Elongation	1 sec	72 °C	4.4 °C/sec
<b>5</b>	Cooling	30 sec	40 °C	1.5 °C/sec

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Primer-Sonden-Kombinationen der qRT-PCR

<b>Gen</b>	<b>Primer 1</b>	<b>Primer 2</b>	<b>Sonde</b>
CDR1	5'-caccagggaaacttatcgtga-3'	5'-tgctggcttgattgttga-3'	#145
CDR2	5'-cccttgattcaatttgcg-3'	5'-aaagaatactgaggccaaaataagg-3'	#9
ERG3	5'-ttatgctgatgtttccctaaaga-3'	5'-gaaaatgattgtatagctggttcaa-3'	#150
ERG6	5'-tgctgctgagggttattca-3'	5'-tcattcaatctttctctcatc-3'	#157
ERG11	5'-ggggttctcacctattacc-3'	5'-agcaaattgtccccaataca-3'	#77
MDR1	5'-atgataatgatgtgatggagataaaa-3'	5'-ggccaatttgagggtttc-3'	#9
MRR1	5'-aattggtgatgattttatgacaca-3'	5'-ttggttacatattgatccaaactcta-3'	#155
MS2	5'-tggtgtgcttagcagagg-3'	5'-cttcacgagcgcaatgg-3'	#90
UPC2	5'-gtccctcgtcaacgtctc-3'	5'-ggctccctgacatggaata-3'	#140



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifizierung neuer antimykotischer Substanzen mit dem AS-HTS-Assay

#### 3.1.1 Screening einer Substanzbibliothek mit dem AS-HTS-Assay

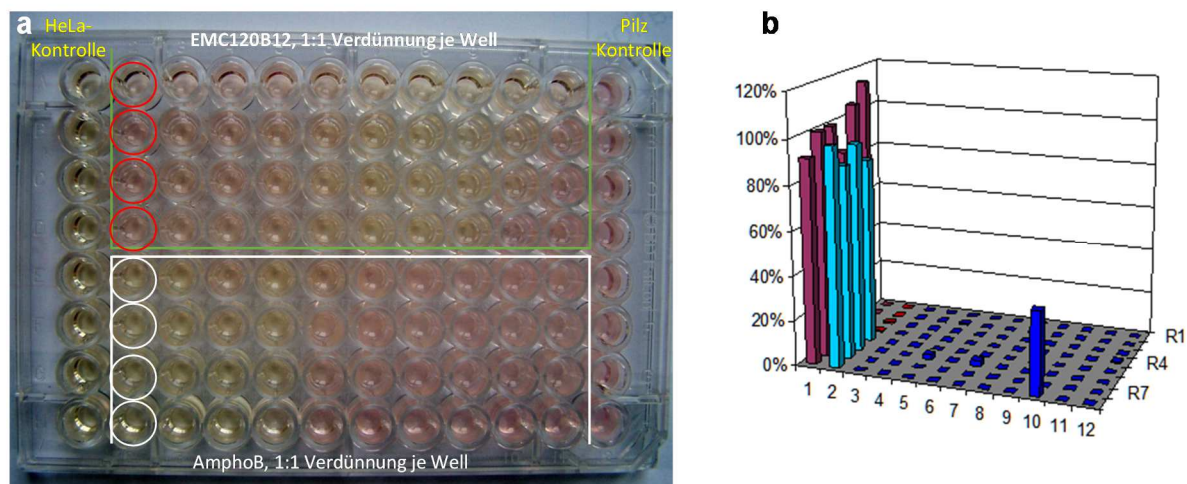
In dieser Arbeit sollen neue antimykotische Substanzen identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurde zu Beginn eine vom Projektpartner EMC microcollections synthetisierte Substanzbibliothek mit verschiedensten heterozyklischen Verbindungen auf mögliche neue antimykotisch wirksame Substanzen getestet. Diese Untersuchungen wurden mit dem Activity-Selectivity-High-Throughput-Screening-Assay (AS-HTS-Assay) durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden lyophilisiert in 96-Well-Platten mit jeweils 80 potentiellen antimykotischen Verbindungen geliefert. Durch Zugabe von DMSO wurden die Substanzen gelöst und jede Substanz einzeln in ein Well mit bereits vorgelegten HeLa-Zellen und *C. albicans*-Zellen auf einer neuen 96-Well-Platte gegeben. Die genaue Vorgehensweise dabei ist im Kapitel Material und Methoden unter 2.9 beschrieben. Die Screening-Platte mit HeLa-Zellen, *C. albicans*-Zellen und den zu testenden Komponenten wurde daraufhin unter den für den AS-HTS-Screening-Assay beschriebenen Bedingungen inkubiert. Nach fünf Tagen Inkubation wurde zu den Zellen eine Lösung mit Fluoresceindiacetat (FDA) gegeben. Die Auswertung der Platten erfolgte über eine Fluoreszenzmessung. Die Überlebensrate der Humanzellen ist mit der antimykotischen Aktivität der Substanz korrelierbar. Überlebende, vitale HeLa-Zellen wurden durch Messung der Fluoreszenz-Intensität identifiziert. Nur lebende Humanzellen metabolisierten das zugegebene FDA in Fluoreszin, dessen Fluoreszenz im Fluoreszenzreader gemessen werden konnte. Eine Auswertung der Fluoreszenz-Daten ist in Abbildung 9b dargestellt. Je höher die Intensität der Fluoreszenz war, desto mehr vitale Humanzellen waren im jeweiligen Well der Platte vorhanden. Auch überlebende Pilzzellen setzen FDA um. Bedingt durch die Zellwand der Pilze findet diese Umsetzung jedoch zeitlich später statt als bei den Humanzellen. Dies wurde zu Beginn dieser Arbeit getestet (Daten nicht gezeigt) und war für die Pilzkontrolle auf der Screening-Platte relevant. Überlebende Humanzellen im Well bedeuten, dass durch die zugegebene Substanz das Pilzwachstum gehemmt oder gestört wurde und somit das Pathogen nicht die Humanzellen angreifen konnte.

Vor der Fluoreszenzmessung wurden die Platten zudem optisch anhand der Farbe des Mediums (Abbildung 9a) und mikroskopisch bewertet. Dies geschah an Tag 1 und Tag 5 nach Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. In Wells, in denen das Pathogen wachsen konnte, behielt das Medium die rote Farbe des RPMI 1640 und kein Farbumschlag von rot nach gelb konnte optisch festgestellt werden. Wells, in denen kein Pilzwachstum optisch zu erkennen war und vitale Humanzellen durch ihre Stoffwechselprodukte das Medium von rot nach gelb verfärbten, wurden genauer mikroskopisch untersucht. Anschließend wurden die vitalen Humanzellen in allen Wells durch die zuvor beschriebene Fluoreszenzmessung genau bestimmt. Waren im Well einer Testsubstanz keine Humanzellen aber zudem auch keine Pilzzellen zu erkennen, handelte es sich in den meisten Fällen um generell zytotoxische Substanzen, die in der verwendeten Konzentration für beide Arten von Zellen toxisch waren. Die zytotoxische Eigenschaft konnte bei diesen Verbindungen durch Mikroskopie für HeLa-Zellen und *Candida*-Zellen und durch die Fluoreszenzmessung für die Humanzellen bestätigt werden. Es wurde keine Fluoreszenz detektiert, da keine vitalen Humanzellen in den Wells zu finden waren. Die Auswertung der Wirkstoffplatten erfolgte durch Berechnung der Fluoreszenzstärke im Vergleich zu den Kontrollen. Die positiv evaluierten Verbindungen aller Screeningplatten wurden in einem Rescreening weiter in anderen Konzentrationen untersucht, um herauszufinden, wie konzentrationsabhängig diese Zytotoxizität war.

Mit dem Assay wurden auf diese Weise insgesamt mehr als 100.000 Substanzen gescreent. Die meisten davon in einem Vorläuferprojekt zu der hier vorgelegten Arbeit. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 3760 Substanzen mit dem AS-HTS-Assay untersucht. Dabei konnten nur wenige auffällige Verbindungen mit antimykotischer Aktivität oder zytotoxischen Eigenschaften gefunden werden, die näher im Rescreening untersucht wurden.

Unter den 100.000 Substanzen des kompletten Screenings wurde eine sehr vielversprechende Verbindung gefunden, durch Resynthese validiert und mit EMC120B12 bezeichnet. Eine Serie von Derivaten dieser Verbindung wurde ebenfalls synthetisiert und getestet (Bauer et al., 2011; Burger-Kentischer et al., 2011), um die wichtigsten Strukturelemente von EMC120B12 für dessen antimykotischen Aktivität festzustellen. Letztendlich zeigte die Substanz EMC120B12 im Vergleich zu den untersuchten Derivaten die höchste antimykotische Aktivität. Daher wurde

EMC120B12 als bester Hit des Screenings ausgewählt, um in dieser Arbeit weiter untersucht und charakterisiert zu werden.



**Abbildung 9: Ergebnis einer Wirkstoffplatte des AS-HTS-Screenings**

**a:** 96-Well-Platte nach 5 tägiger Inkubation nach AS-HTS-Assay-Bedingungen. Überlebende Humanzellen sind durch den Farbumschlag des Mediums zu erkennen: Lebende Humanzellen verfärben das RPMI1640-Medium durch Stoffwechselprodukte von rot nach gelb. Rotes Medium: Keine überlebenden Humanzellen bedingt durch Pilzwachstum oder zytotoxische Effekte der getesteten Substanz. Mit Kreisen sind die Wells mit den Start-Konzentrationen der Titration der jeweiligen antimykotischen Substanz gekennzeichnet. Aus diesen Wells erfolgt eine 1:1-Verdünnung der Substanzen.

**b:** Auswertung des Screenings einer Wirkstoffplatte mit potentiellen antimykotischen Substanzen mit Hit in Well A10 (Dunkelrot: Nullkontrolle; Hellblau: Amphotericin-Kontrolle; Dunkelblau: Wirkstoff-Hit mit 37 % antimykotischer Aktivität). Durch eine Fluoreszenzmessung werden die vitalen HeLa-Zellen bestimmt. Die Fluoreszenz kann mit der antimykotischen Aktivität der Testsubstanzen korreliert werden.

### 3.1.2 Rescreening auffälliger Einzelkomponenten aus dem AS-HTS-Screening

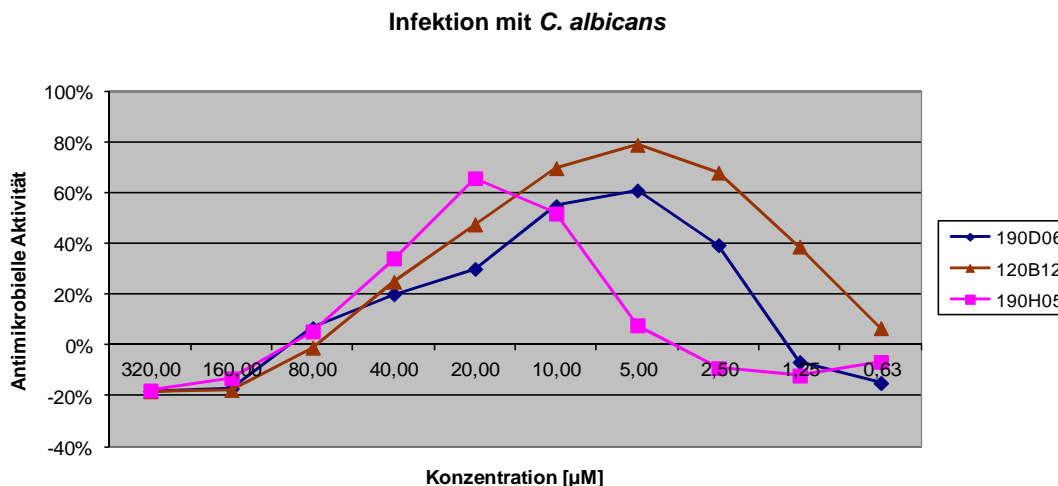
Die Verbindungen des Screenings der 3760 Substanzen, bei denen in der Test-Konzentration eine antimykotische Aktivität oder Zytotoxizität gezeigt werden konnte, wurden in einem Rescreening in einer Konzentrationenreihe untersucht. Eine Verbindung galt nach dem ersten Screening als positiv, wenn eine antimykotische Aktivität von mindestens 10 % detektiert werden konnte. Alle diese auffälligen Verbindungen wurden in Konzentrationen zwischen 320  $\mu\text{M}$  bis 0,625  $\mu\text{M}$  in einem Rescreening eingesetzt. Die Platten wurden ebenfalls wie für das erste Screening mit HeLa-Zellen und Pilzzellen versetzt und die Verbindungen wurden je Well zugegeben. Hierdurch wurde überprüft, ob die antimykotische Aktivität zunimmt oder, ob bei zytotoxischen Verbindungen dieser Effekt verringert wird. Als Pathogen wurde *C. albicans* verwendet. Bei sechs Verbindungen des Rescreenings konnte eine relevante antimykotische Aktivität von über 10 % nachgewiesen werden. Fünf dieser Verbindungen waren EMC120B12-Derivate und ein neu synthetisiertes Batch von

EMC120B12. Eine sechste Verbindung, patho66-H10, zeigte in den Konzentration 320 $\mu$ M und 160 $\mu$ M eine antimykotische Aktivität. Dies konnte auch nach Einfrieren und Auftauen der Probe reproduziert werden. Die antimykotische Aktivität war bei dieser Substanz jedoch nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurde die Substanz nicht weiter verfolgt.

### **3.1.3 Titration von Substanzen mit dem AS-HTS-Assay und Bestimmung des IC<sub>50</sub>**

Mit Hilfe des Screening-Assay lassen sich nicht nur schnell antimykotische und zugleich nicht zytotoxische Verbindungen in einem Schritt identifizieren, es ist zudem eine Titration der Substanzen zur Bestimmung des IC<sub>50</sub> (half inhibitory concentration) möglich. Der IC<sub>50</sub>-Wert konnte mittels des AS-HTS-Assay für alle fünf aus dem Rescreening als relevant hervorgegangenen EMC120B12-Derivate erfolgreich bestimmt werden. Die Ergebnisse sind beispielhaft für drei sich sehr ähnliche Derivate von EMC120B12 in Abbildung 10 aufgeführt. Unter diesen drei Testsubstanzen befand sich auch ein neues Batch der Substanz. Die Titration für das neue Batch von EMC120B12 (brauner Graph) zeigte unter den Substanzen den niedrigsten IC<sub>50</sub>. Bei potentiellen Wirkstoffen wird hierbei immer ein möglichst niedriger Wert angestrebt. Zudem konnten im Vergleich zu den anderen Derivaten bei höheren Konzentrationen von EMC120B12 die meisten vitalen Humanzellen detektiert werden, was für eine gute Verträglichkeit der Substanz spricht. Je mehr vitale Humanzellen in Anwesenheit des Pathogens detektiert werden konnten, desto höher ist die antimikrobielle Aktivität einer Substanz. Dann musste das Wachstum und die Pathogenität der *Candida* spp.-Zellen im jeweiligen Well durch die Testsubstanz gehemmt, beziehungsweise durch die Substanz getötet worden sein. Daher ist antimikrobielle Aktivität im Screening proportional zur Überlebensrate der Humanzellen, welche in Abbildung 10 auf der y-Achse abgelesen werden kann. Die beiden anderen Substanzen und die Derivate der Verbindung EMC120B12 zeigten eine geringere antimykotische Aktivität und höhere IC<sub>50</sub>-Werte. EMC120B12 ging somit auch aus dem Rescreening und der Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes als beste der Substanzen hervor.





**Abbildung 10: Titration von Substanzen mit dem AS-HTS-Assay**

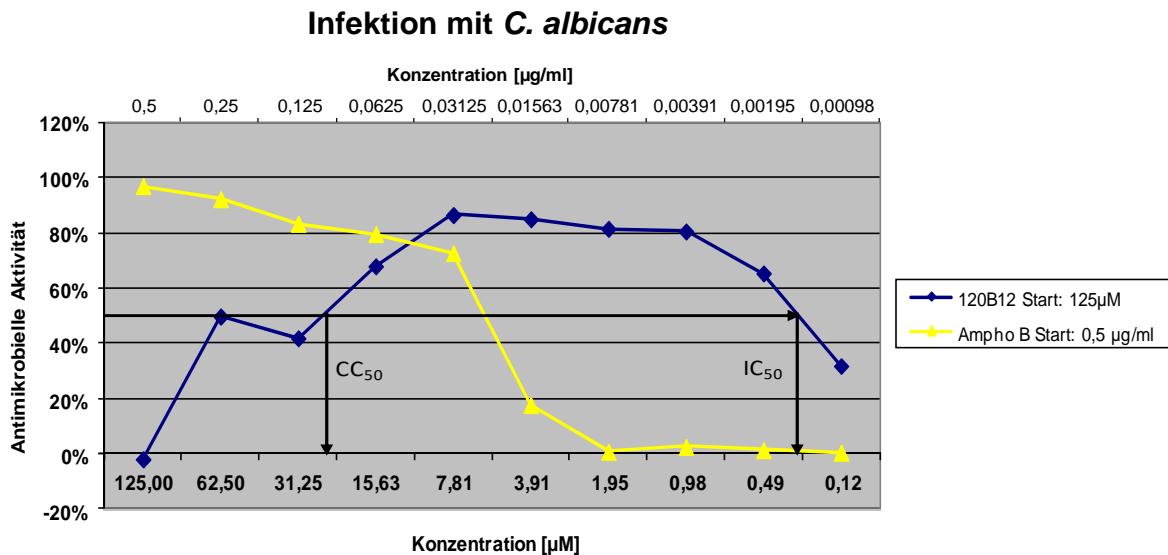
Im Rescreening wurden die auffälligen Substanzen in den Konzentrationen zwischen 320 µM bis 0,625 µM mit Hilfe des AS-HTS-Assay untersucht. Hierbei konnte beim neuen Batch von EMC120B12 (brauner Graph) der niedrigste IC<sub>50</sub>-Wert und zudem die meisten vitalen Humanzellen detektiert werden.

### 3.2 Die neue antimykotische Substanz EMC120B12

Aus den insgesamt über 100.000 getesteten Substanzen wurde somit eine Substanz ausgewählt, das Benzimidazol EMC120B12. Es erfüllte alle im Projekt festgelegten Kriterien, die eine Substanz zur gleichen Zeit unter den Assay-Bedingungen erfüllen muss, um als vielversprechend zu gelten. Zu diesen Kriterien zählt eine hohe Überlebensrate der Humanzellen im ersten Screening sowie im Rescreening. Dies bedeutet, dass die Substanz nicht zytotoxisch für die Wirtszellen ist. Zudem muss die Substanz das Wachstum von *Candida* spp. blockieren und die Löslichkeit der Substanz in DMSO und im Medium muss gewährleistet sein.

Wie in 2.9.2 gezeigt konnten mittels des AS-HTS-Assay alle interessanten Verbindungen titriert und die Überlebensrate der Humanzellen gemessen werden. EMC120B12 zeigte das beste Ergebnis. Daher wurden für diese Substanz die Test-Konzentrationen auf zwischen 125 µM und 0,12 µM weiter angepasst. So konnte durch weitere Titration der genaue IC<sub>50</sub> und CC<sub>50</sub> bestimmt werden. In Abbildung 11 ist für EMC120B12 der IC<sub>50</sub> und die Selektivität der Substanz, welche über den SI-Wert bestimmt wurde, eingezeichnet. Der SI-Wert für EMC120B12 liegt bei 63, der IC<sub>50</sub>-Wert beträgt 0,4 µM. Je größer die Selektivität, desto kleiner ist der Konzentrationsbereich in dem die Substanz toxisch ist oder nicht gegen das Pathogen wirkt. Der SI-Wert setzt sich wie folgt zusammen:  $SI = CC_{50} / IC_{50}$ , wobei es sich beim CC<sub>50</sub> um die „half cytotoxic concentration“ handelt. Eine gute Verträglichkeit der

Humanzellen konnte darüber hinaus durch die Titration für EMC120B12 bestätigt werden. Da zu Beginn der Herstellung von EMC120B12 Schwankungen in der Toxizität der Substanz-Präparationen zu beobachten waren, wurden verschiedene Produktionsbatches verglichen und das optimale Batch für die weiteren Versuche ausgewählt.



**Abbildung 11: Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Werts mit dem AS-HTS-Assay für *C. albicans***

Durch Pfeile sind der IC<sub>50</sub>-Wert und der CC<sub>50</sub>-Wert für EMC120B12 auf der X-Achse gekennzeichnet. Der IC<sub>50</sub>-Wert für dieses Batch EMC120B12 liegt für *C. albicans* bei 0,4 µM, der SI-Wert beträgt 63.

### 3.3 Validierung des AS-HTS-Assays

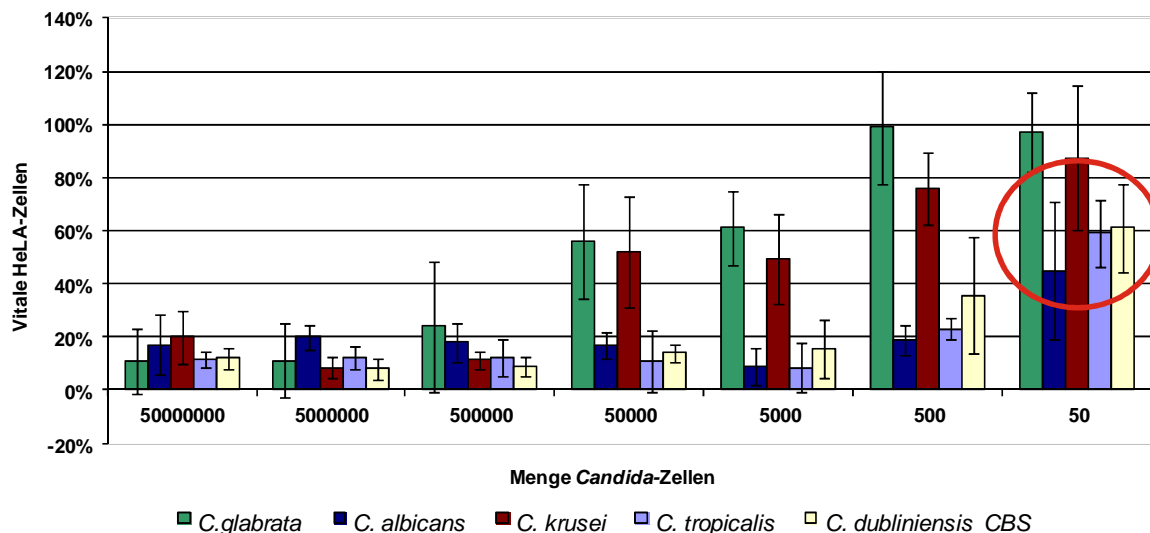
#### 3.3.1 Adaption des AS-HTS-Assays an weitere *Candida* spp.

Um die Wirkung von Substanzen im Assay neben *C. albicans* auch auf weitere *Candida*-Spezies testen zu können, wurde der AS-HTS-Assay auf *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* und *Candida dubliniensis* adaptiert. Dazu musste zunächst die erforderliche Menge an *Candida*-Zellen der verschiedenen *Candida*-Spezies für eine erfolgreiche Infektion und Zerstörung der Humanzellen bestimmt werden. Diese optimale Zellzahl wurde mit einer für diesen Zweck modifizierten Variante des AS-HTS-Assay für jede Spezies ermittelt. In dieser Versuchsanordnung wurde ohne Zusatz von Testsubstanz gearbeitet. Die Pilzzellen wurden beginnend mit 50 Zellen pro Well in 10er Potenzen steigender Anzahl dem Assay zugegeben. *C. albicans* wurde als Vergleich und Referenzstamm mitgeführt, da hier die optimale Zellzahl für den Einsatz in das Screening bekannt ist und bei 50 Zellen liegt. Für die anderen Stämme sollte das Ausmaß der zerstörten Humanzellen im Test gleich oder

ähnlich dem Ergebnis für *C. albicans* sein. So ist auch für diese Stämme eine optimale Zellzahl für den AS-HTS-Assay gewährleistet.

Anhand der in Abbildung 12 dargestellten erhaltenen Ergebnisse ist ersichtlich, dass die Adaption des Screening-Assays an *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* erfolgreich war. Im Vergleich zum mitgeführten Referenzstamm *C. albicans* ist hier eine ähnliche Menge an *Candida*-Zellen nötig, um ein Ergebnis wie für *C. albicans* zu erreichen. Die optimale Zellzahl für den AS-HTS konnte bestimmt werden. Die erhaltenen Werte aller Stufen der *Candida*-Zellen-Verdünnung sind für *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* den Werten von *C. albicans* sehr ähnlich. Die optimale Zellzahl für eine ausreichende und erfolgreiche Zerstörung der Humanzellen liegt im Bereich um 50 Zellen pro Well. Bei dieser Anzahl liegt der Wert der überlebenden Humanzellen in dieser Versuchsanordnung im Mittel bei 50 %.

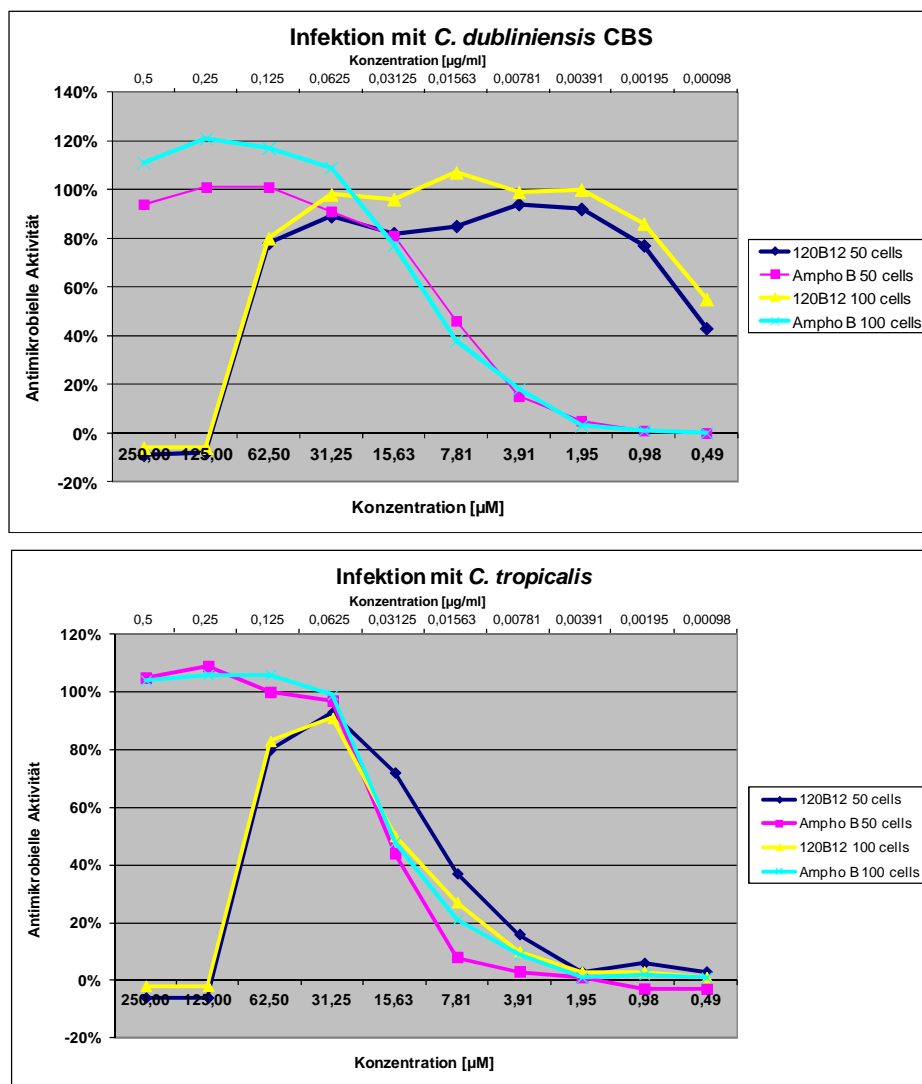
Für *C. glabrata* und *C. krusei* konnte der Assay nicht adaptiert werden. Um eine erfolgreiche Zerstörung der Humanzellen im gewünschten Ausmaß zu detektieren, sind so große Mengen an Pilzzellen nötig, dass hier nicht die Zerstörung der Humanzellen direkt durch eine Infektion der *Candida*-Zellen, sondern ebenso eine Konkurrenz um Nährstoffe im Medium und Sauerstoff die Humanzellen absterben lassen könnte.



**Abbildung 12: Erweiterung des AS-HTS-Assays auf *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. dubliniensis***

Durch die Ermittlung der optimalen Zellzahl für weitere *Candida*-Spezies soll die Bestimmung des IC<sub>50</sub> und CC<sub>50</sub>-Wertes antimykotisch wirksamer Substanzen für weitere in der Klinik relevante *Candida*-Stämme ermöglicht werden. Die Adaption für *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* war erfolgreich. Die benötigte Zellzahl pro Well liegt im Bereich von um 50 Zellen pro Well. Für *C. glabrata* und *C. krusei* sind zu große Zellzahlen nötig, der Assay konnte an diese Stämme nicht adaptiert werden.

Um die Ergebnisse für *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* zu präzisieren und den Bereich der optimalen *Candida*-Zellzahl genau festzulegen, wurden Tests mit 50 und 100 Zellen pro Well im Vergleich durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Verwendet wurden *C. tropicalis* und die Stämme *C. dubliniensis* CBS und *C. dubliniensis* WÜ. Es wurde wie für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung von EMC120B12 beschrieben vorgegangen und neben EMC120B12 auch Amphotericin B in Konzentrationsreihen verwendet. Pro Well und Stamm wurde je mit 50 und mit 100 Pilzzellen getestet. Die Auswertung im Fluoreszenzreader zeigte nur kleine Schwankungen, die im Rahmen des Assays als normale Abweichung zu sehen sind. Da so keine Unterschiede zwischen 50 Zellen und 100 Zellen pro Well zu detektieren waren, wurden anhand der Ergebnisse für *C. tropicalis* wie für *C. dubliniensis* ebenso wie für *C. albicans* 50 Zellen als optimale Zellzahl für den AS-HTS-Assay festgelegt und im Weiteren eingesetzt.



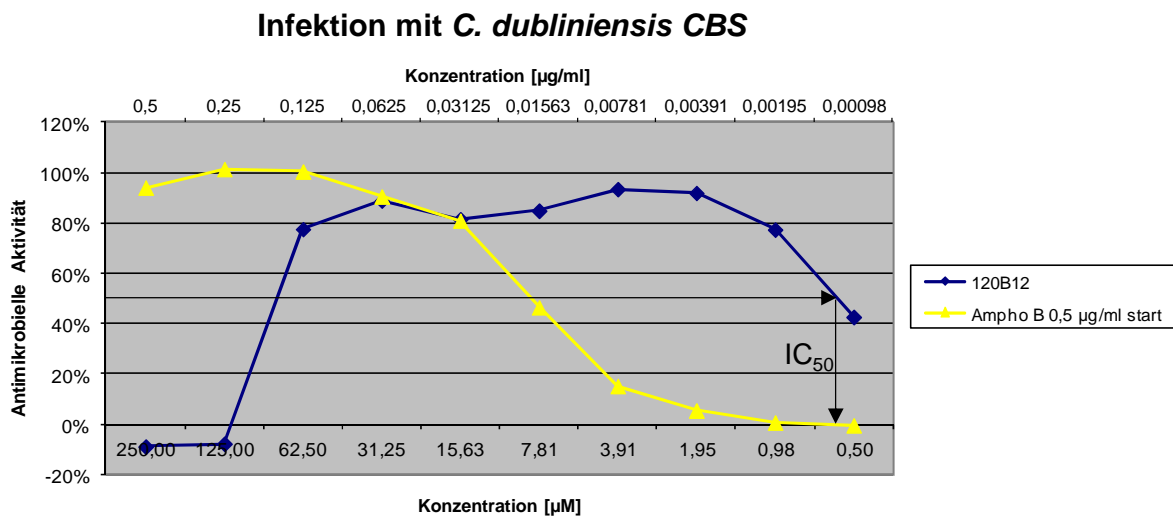
**Abbildung 13: Bestimmung der optimalen Zellzahl nach Erweiterung des AS-HTS-Assays auf weitere *Candida*-Spezies**

Getestet wurden 50 und 100 Pilzzellen pro Well für eine Infektion sowohl für *C. dubliniensis* als auch für *C. tropicalis*. Es waren keine signifikanten Abweichungen zwischen 100 und 50 Zellen bei beiden Stämmen zu erkennen, daher wurden für künftige Versuche 50 Zellen pro Well für beide Spezies festgelegt. Startkonzentrationen: EMC120B12 250 µM, Amphotericin B (Ampho B) 0,5 µg/ml.

Durch diese Adaption konnte im Anschluss der IC<sub>50</sub> der drei Stämme bestimmt werden. Abbildung 14 zeigt die Auswertung der Daten der Fluoreszenzmessung für *C. dubliniensis* und Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse für *C. tropicalis*. Die IC<sub>50</sub>-Werte für *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* können an der jeweiligen Grafik abgelesen werden und sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Wie erwartet, hatten die Werte für beide *C. dubliniensis* Stämme die gleiche Tendenz, daher ist in Abbildung 14 nur ein Stamm dargestellt. Der IC<sub>50</sub> für *C. dubliniensis* EMC120B12 liegt bei 0,5 µM. Für *C. tropicalis* liegt der IC<sub>50</sub> bei 11,7 µM.

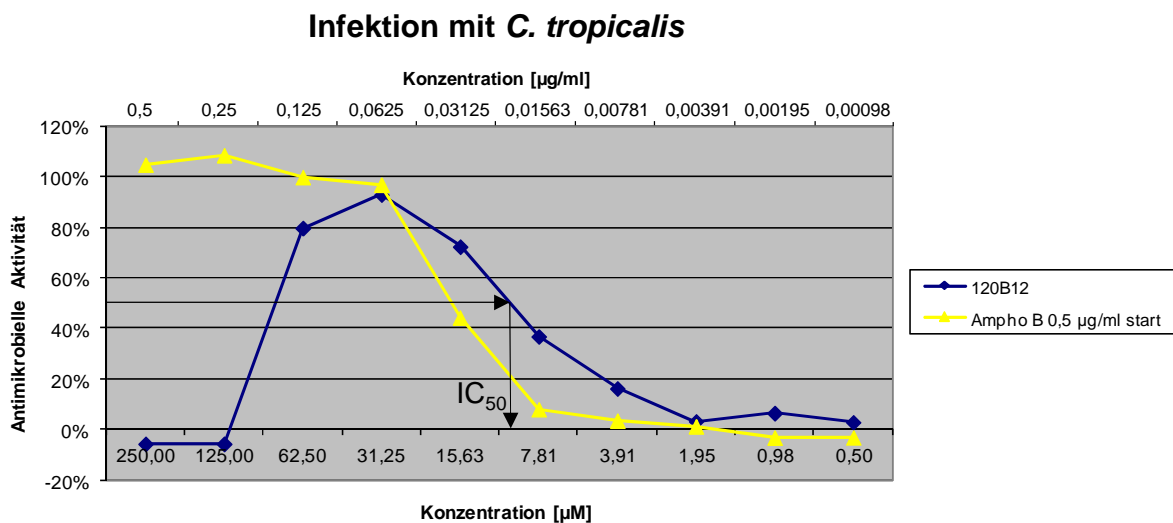
Damit konnte die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte antimykotisch wirksamer Substanzen nicht nur für *C. albicans*, sondern auch für weitere in der Klinik relevante *Candida*-Stämme ermöglicht werden.

Diese Stämme sind durch die erfolgreiche Adaption nun auch im AS-HTS-Assay einsetzbar und weitere Untersuchungen bezüglich EMC120B12 sind durch die erfolgreiche Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte mit weiteren Stämmen neben *C. albicans* möglich.



**Abbildung 14: Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes mit dem AS-HTS-Assay für *C. dubliniensis* CBS**

Durch Pfeile ist der IC<sub>50</sub>-Wert auf der x-Achse gekennzeichnet. Dieser liegt bei ungefähr 0,5 µM EMC120B12. Für den Stamm *C. dubliniensis* WÜ konnte die selbe Tendenz für den IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden (nicht dargestellt).



**Abbildung 15: Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes mit dem AS-HTS-Assay für *C. tropicalis***

Durch Pfeile ist der IC<sub>50</sub>-Wert auf der x-Achse gekennzeichnet. Der IC<sub>50</sub>-Wert von EMC120B12 liegt für *C. tropicalis* bei 11,7 µM.

### 3.3.2 Limitierung des AS-HTS-Assays

Die in 2.10 beschriebene Adaption des Assays an weitere *Candida*-Spezies zeigte bereits eine Limitierung für gewisse Arten.

Für *C. glabrata* und *C. krusei* konnte gezeigt werden, dass die Menge an *Candida*-Zellen für eine Zerstörung der Humanzellen im gewünschten Maße zu hoch ist, um für einen Assay im 96-Well Maßstab relevant zu sein. Diese beiden *Candida*-Arten, welche keine Hyphen bilden, sind für den Einsatz im Assay somit nicht geeignet. Es konnte daher kein IC<sub>50</sub>- und CC<sub>50</sub>-Wert für *C. glabrata* und *C. krusei* bestimmt werden. *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* hingegen, welche Hyphen bilden können, zeigten ein einheitliches Verhalten bei der Adaption und können alle im Assay als Pathogen verwendet werden.

Auf Komponentenebene könnte eine weitere Limitierung des AS-HTS-Screenings eine eventuelle Instabilität der Substanzen in Lösung, insbesondere im Humanmedium, bei bestimmten pH oder bei bestimmter Lagerung sein. Es ist möglich, dass dadurch Substanzen gar nicht oder nicht vollständig in Lösung gehen. Dies war in dieser Arbeit ein sehr seltener Fall. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ist für solche Fälle und als zusätzlicher Test der Substanzen zudem über EUCAST möglich. Der MHK-Wert stellt die geringste Konzentration einer Substanz dar, die das sichtbare Wachstum des Mikroorganismus nach einer Inkubation über Nacht inhibiert. EUCAST als bekannte Standard-Methode hat den Vorteil, dass Spezies wie *C. glabrata* getestet werden und zudem weitere Pilzarten ohne Adaption eingesetzt werden können. Der große Nachteil dieser Methode ist, dass hier nicht die Wirkung von Testsubstanz auf Humanzellen getestet werden kann und keine Informationen über die Substanz in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt erhalten werden. Die Ergebnisse des AS-HTS bilden die Interaktion und Wirkung der Substanz in vivo sehr real ab.

### 3.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von EMC120B12 und Fluconazol

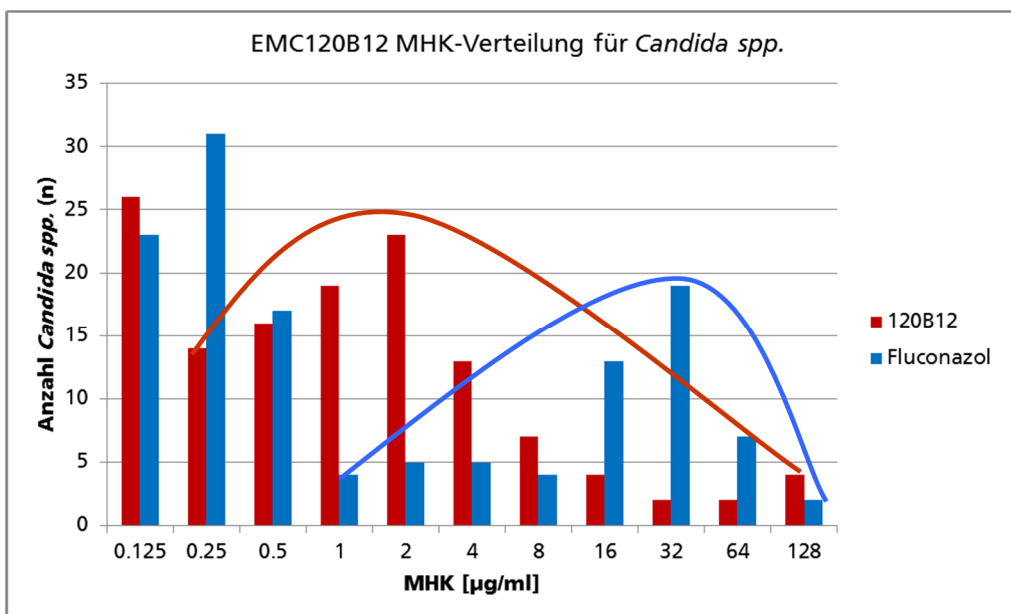
#### 3.4.1 MHK-Bestimmung mittels EUCAST für verschiedene *Candida*-Spezies

In der Arbeit von Burger Kentischer et al. wurde für eine Sammlung an 150 *Candida*-Stämmen, bestehend aus mehreren Spezies, die minimale Hemmkonzentration (MHK) für EMC120B12 und Fluconazol mittels EUCAST bestimmt. Die dort erhaltenen Werte wurden in dieser Arbeit hier weiter aufgearbeitet und ausgewertet. Je kleiner der MHK-Wert desto wirksamer ist die Substanz.

In Abbildung 16 ist die Verteilung der MHK-Werte für alle 150 getesteten Stämme nach deren Häufigkeit aufgetragen. In dieser Darstellung ist gut zu erkennen, dass nach einer Behandlung mit EMC120B12 die MHK-Werte viel kleiner sind, als die Werte nach einer Behandlung mit Fluconazol. Es sind also geringere Konzentrationen an EMC120B12 für den gleichen Effekt nötig. Bei Fluconazol waren die Werte für die getesteten Spezies vorwiegend im hohen Bereich (blaue Kurve) zu finden, für EMC120B12 waren bei diesen Isolaten die meisten Werte in sehr niedrigen Bereichen (rote Kurve). Der Shift zwischen den beiden Substanzen ist in dieser Darstellung sehr gut erkennbar und zeigt, dass gegen Fluconazol mehr Isolate Resistenz zeigen.

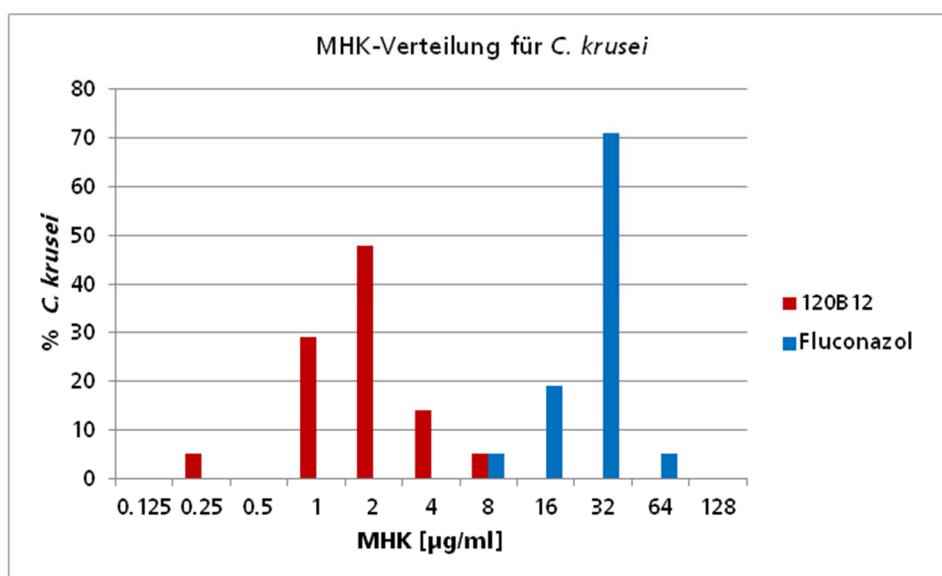
Insbesondere für *C. krusei* waren die Werte interessant. In Abbildung 17 ist die MHK-Verteilung für alle getestet *C. krusei*-Isolate dargestellt. Durch die intrinsische Resistenz des Pilzes gegen Fluconazol, zeigten alle Isolate einen sehr hohen MHK für dieses Azol. EMC120B12 hatte auf die gleichen Isolate schon in geringen Konzentrationen eine Wirkung. Die MHK-Verteilung war auch bei diesen für Fluconazol resistenten Stämmen in niedrigen Bereichen. Der höchste Wert für EMC120B12 entspricht mit 8 µg/ml dem niedrigsten von Fluconazol. Der Vergleich der beiden Substanzen mit den Werten ist ebenfalls tabellarisch in Abbildung 17 dargestellt. Auch bei den getesteten *C. glabrata* konnten niedrigere MHK-Werte für EMC120B12 im Vergleich zu Fluconazol bestimmt werden (Daten im Anhang). Im Allgemeinen sind viel weniger resistente Stämme aller Spezies gegen EMC120B12 gefunden worden, wie dies für Fluconazol der Fall ist.





**Abbildung 16: MHK-Verteilung von 150 *Candida*-Stämmen verschiedener Spezies**

MHK für EMC120B12 und Fluconazol nach EUCAST bestimmt. Nach einer Behandlung mit EMC120B12 sind bei den gleichen Stämmen kleinere MHK-Werte detekrierbar als nach einer Behandlung mit Fluconazol.



Spezies	MHK [µg/ml]	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
C. krusei (n=21)	EMC120B12	0	5	0	29	48	14	5	0	0	0	0
	Fluconazol	0	0	0	0	0	0	5	19	71	5	0

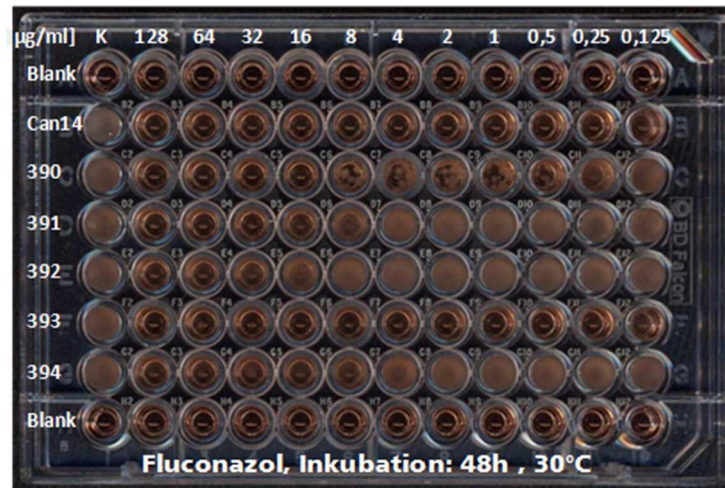
**Abbildung 17: MHK-Verteilung für *C. krusei***

MHK nach EUCAST bestimmt. Die Darstellungen zeigen deutlich die Resistenz des Pilzes gegen Fluconazol. EMC120B12 ist hingegen schon in geringen Konzentrationen gegen *C. krusei* wirksam.

### 3.4.2 MHK-Bestimmung mittels EUCAST zur Selektion von Stämmen für die Sterol-Analytik

Anhand der unter 3.4.1 gezeigten Ergebnisse der 150 *Candida*-Isolate wurden besonders interessante Stämme ausgewählt und nochmals genauer getestet. Weitere neue Isolate, deren Resistenzen ebenfalls interessant für weitere Versuche sind, wurden ebenfalls getestet. Von diesen ausgewählten Stämmen soll in der weiteren Arbeit die Sterol-Zusammensetzung untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Mechanismen von EMC120B12 ziehen zu können. Die MHKs der getesteten Substanzen unterschieden sich insbesondere für *C. krusei*-Isolate, daher wurden für alle verfügbaren *C. krusei*-Isolate und den weiteren Pool an sensitiven und resistenten *C. albicans*-Isolaten die MHKs nach dem EUCAST-Protokoll neu bestimmt und bei bereits getesteten Stämmen verifiziert. So wurden nochmals über 50 Stämme auf ihre Resistenz oder Sensitivität gegenüber EMC120B12 und Fluconazol getestet.

Um die Konzentration der Wirkstoffe zu ermitteln, die zur deutlichen Inhibition des Pilzwachstums notwendig ist, wurden die *Candida* spp. zusammen mit einem Wirkstoff (Fluconazol oder EMC120B12) in unterschiedlichen Konzentrationen in 96-Well-Platten inkubiert. Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Bestimmung der Zelldichte in den Kulturen durch Messung der optischen Dichte in jedem Well bei einer Wellenlänge von 530 nm mit Hilfe eines UV-Reader. Abbildung 18 zeigt eine nach dem EUCAST-Protokoll angesetzte Platte nach 48 Stunden Inkubation. Die erhaltenen Daten und der MHK-Wert, der für die unter 3.8.1 aufgeführte Sterolanalytik relevanten Stämme, sind in Abbildung 19 für EMC120B12 dargestellt. In den Diagrammen ist die Wirkstoffkonzentration gegen die optische Dichte (OD) aufgetragen. Das Isolat Can14, der *C. albicans* Wildtyp, diente auf allen Platten als sensitiver Vergleichsorganismus.

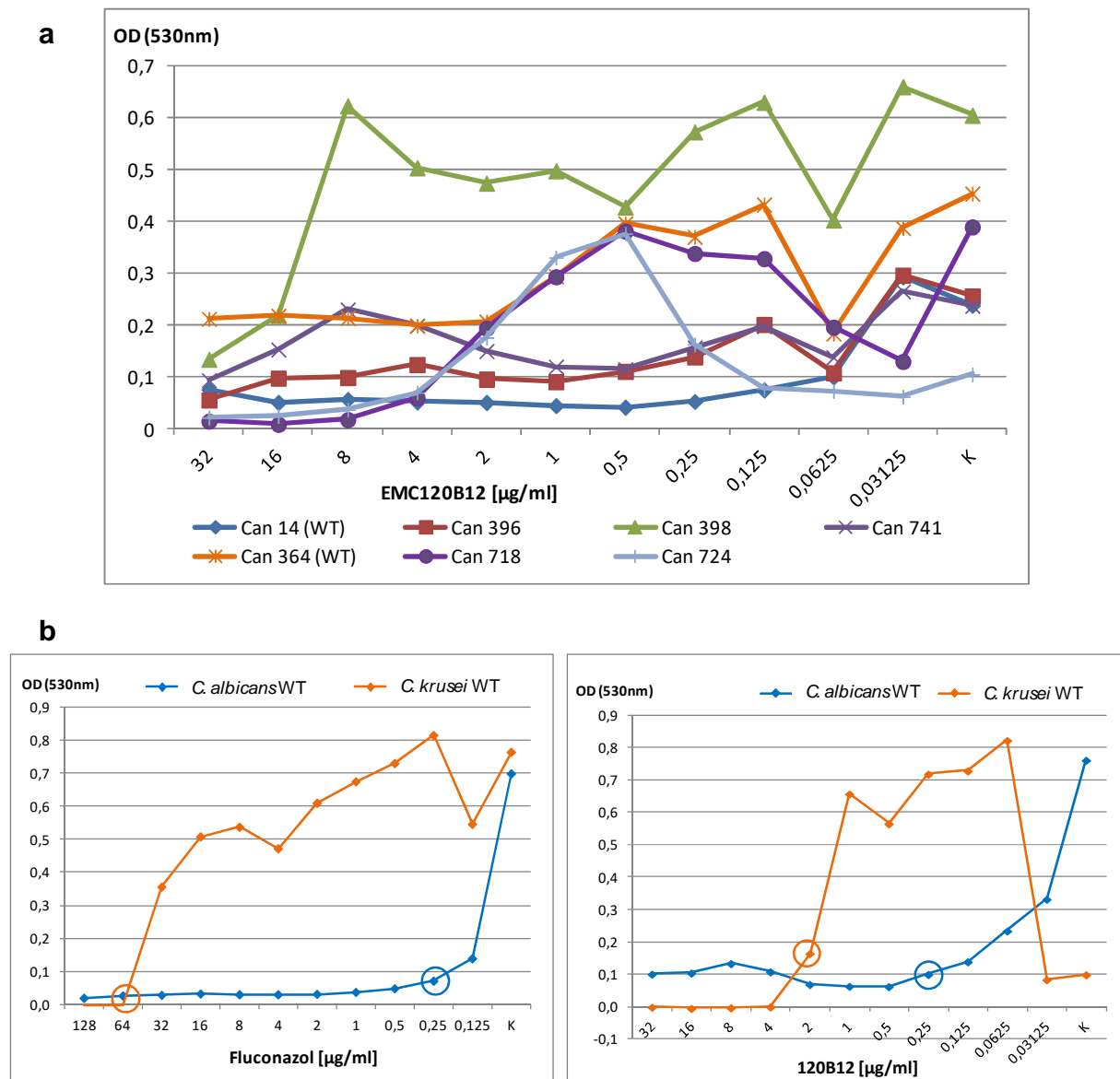


**Abbildung 18: Gescannte 96-Well-Platte zur Bestimmung von MHK-Werten nach EUCAST**

Verschiedene *Candida* spp. behandelt mit Fluconazol.

Nach einer Inkubation mit EMC120B12 waren alle getesteten Isolate in ihrem Wachstum gehemmt werden (Abbildung 19a). Can14 und Can396 reagierten auf EMC120B12 am sensitivsten und wuchsen nur in den beiden niedrigsten Konzentrationen und in der unbehandelten Kontrolle. Bei den *C. krusei*-Isolate war erst ab etwa 1-2 µg/ml EMC120B12 war eine Zunahme ihres Wachstums erkennbar, in höheren Konzentrationen wurde das Wachstum inhibiert. Und auch die Fluconazol-resistenten Isolate Can398 und Can741 wurden durch 32 µg/ml deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Für die wichtigsten Stämme der weiteren Versuche, dem *C. albicans* Wildtyp und dem *C. krusei* Wildtyp, sind zur besseren Übersicht die Mittelwerte aus mehreren Messungen für EMC120B12 und zum Vergleich die Werte nach Inkubation mit Fluconazol in Abbildung 19b nochmal zusammengefasst und die MHKs markiert. Hier ist der deutliche Unterschied zwischen den beiden Substanzen bei *C. krusei* sehr gut zu erkennen. *C. krusei* war bei Fluconazol bis in die hohen Konzentrationen ein Wachstum des Pilzes und somit eine Resistenz gegenüber Fluconazol zu erkennen. Nach einer Inkubation mit EMC120B12 wird das *C. krusei*-Wachstum jedoch inhibiert. *C. albicans* Can14 zeigte sich sensitiv gegenüber Fluconazol und gegenüber EMC120B12. Anhand der Diagramme konnte die minimale Hemmkonzentration der Substanz für den jeweiligen *Candida*-Stamm abgelesen werden. Bei *C. krusei* liegt die MHK für Fluconazol 64 µg/ml und für EMC120B12 2 µg/ml. Beim *C. albicans* Wildtyp (Can14) beträgt die MHK für Fluconazol 0,25 µg/ml und für EMC120B12 ebenfalls 0,25 µg/ml.

Alle MHK-Bestimmungen zeigten, dass EMC120B12 gegen die meisten pathogenen Hefen wirkt. Es ist ein klarer Trend bei den MHKs ersichtlich und es kommt zu einer Verschiebung der MHKs zwischen Fluconazol und EMC120B12. Die Resistenzen sind jedoch nicht Klassen zuzuordnen. Dies spricht für dasselbe Target bei beiden Substanzen. Um dies weiter zu untersuchen werden die ausgewählten Stämme in die Sterolanalytik eingesetzt.



**Abbildung 19: Bestimmung der MHK-Werte für Fluconazol und EMC120B12 mittels EUCAST**

Gemessen wurde die optische Dichte der EUCAST-Platten bei einer Wellenlänge von 530 nm mit Hilfe eines UV-Reader. Verwendete Isolate.

*C. albicans*: Can14 (*C. albicans* WT), Can396, Can398, Can741

*C. krusei*: Can718, Can724

K: Kontrolle

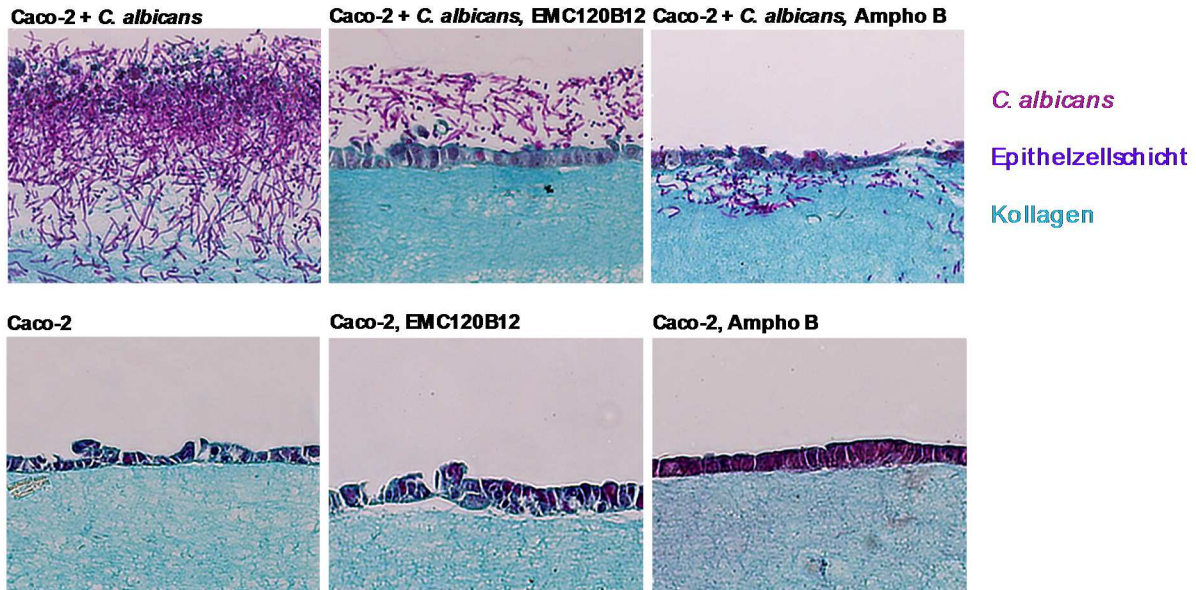
**a**: Bestimmung der MHKs von EMC120B12 für genannte Isolate. Die Wirkstoffkonzentration in  $\mu\text{g/ml}$  wurde gegen die optische Dichte aufgetragen.

**b**: Daten und MHK-Bestimmung für *C. albicans* Wildtyp und *C. krusei* Wildtyp. Mit den Kreisen sind die MHKs der jeweiligen Substanz markiert.

### 3.5 Die neue antimykotische Substanz EMC120B12 in komplexen Hautmodellen

Um weitere Informationen über die Verträglichkeit, die Effizienz, die Gewebegängigkeit und die Effektivität der Substanz EMC120B12 in komplexeren Modellen zu erhalten, wurden weitere Tests mit einem *in vitro* 3D-Modells mit Darmepithelzellen durchgeführt. Zudem sollten weitere Aussagen über das invasive Verhalten der zuvor im AS-HTS-Assay adaptierten und getesteten *Candida*-Spezies (siehe 3.3.1) und über den Einsatz des komplexen Hautmodells für diese Spezies gemacht werden.

Um die antimykotische Wirkung und die Stabilität der Substanz in einem komplexen Epithelmodell zu untersuchen, wurde das 3D-Modell mit *C. albicans* infiziert und EMC120B12 im zuvor bestimmten IC<sub>50</sub>-Wert zugegeben. Die Inkubationszeit betrug für alle Versuche 24 Stunden. Nach Auswertung der P.A.S. gefärbten Gewebeschnitte konnte der antimykotische Effekt und die Gewebegängigkeit von EMC120B12 in einem komplexen Epithelmodell bestätigt werden. Dies ist deutlich in Abbildung 20 durch das reduzierte Wachstum der *Candida*-Zellen und einer intakten Humanzellschicht zu erkennen (Caco-2 + *C. albicans*). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EMC120B12 sowohl auf einen Humanzell-Monolayer, wie unter 3.1, im AS-HTS-Screening gezeigt, als auch auf Humanzellen in einem komplexen Modell keine zytotoxischen Effekte hat (Caco-2, EMC120B12). Die Humanzellen sind intakt und optisch nicht von der Humanzellkontrolle ohne jegliche Zugabe von Substanzen (Caco-2) zu unterscheiden. EMC120B12 hat einen vergleichbar guten antimykotischen Effekt auf *C. albicans* (Caco-2 + *C. albicans*, EMC120B12) wie das zur Kontrolle verwendete Amphotericin B (Caco-2 + *C. albicans*, Ampho B). Bei beiden Proben ist das Wachstum des Pilzes gehemmt. Dies bestätigt die Gewebegängigkeit, die Verträglichkeit und die Effektivität der Substanz EMC120B12 in komplexeren Modellen auch im Vergleich zu einem gängigen Antimykotikum wie Amphotericin B.



**Abbildung 20: Effekt von EMC120B12 in einem *in vitro* 3D-Epithelmodell (Darmepithelzelllinie Caco-2) nach Infektion mit *C. albicans***

Schnitte mit und ohne Infektion mit *C. albicans* auf Kollagen-Matrix.

Mikroskopie von Gewebeschnitten P.A.S. gefärbter *in vitro* 3D-Epithelmodelle. Infektionsdauer 24 h bei 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>.

Blau: Kollagen, violett: Caco-2 Zellschicht, pink: *C. albicans*.

Von links nach rechts: 1: Kontrolle, Infektion von Caco-2 mit *C. albicans*, 2: Infektion von Caco-2 mit *C. albicans* unter Zugabe von EMC120B12 (IC<sub>50</sub>), 3: Infektion von Caco-2 mit *C. albicans* unter Zugabe von Amphotericin B, 4: Kontrolle, Caco-2 ohne Infektion, 5: Caco-2 unter Zugabe von EMC120B12, 6: Caco-2 unter Zugabe von Amphotericin B.

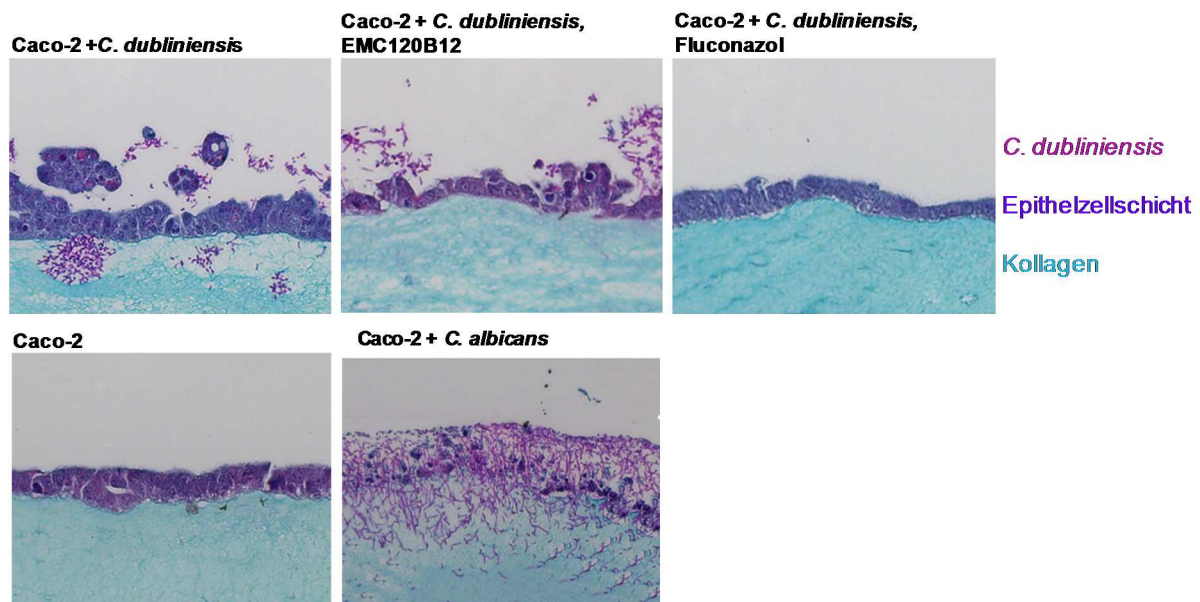
Durch die erfolgreiche Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes für *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* konnte der Effekt von EMC120B12 auf ein *in vitro* 3D-Modell mit Darmepithelzellen auch mit *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* getestet werden. Ein *C. albicans*-infiziertes Gewebemodell wurde bei jedem dieser Experimente als Kontrolle mitgeführt. Der Versuchsaufbau war identisch zu den zuvor beschriebenen Versuchen mit *C. albicans*. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 für *C. dubliniensis* und in Abbildung 22 für *C. tropicalis* dargestellt. Auch in diesem Ansatz waren keine zytotoxischen Effekte von EMC120B12 auf die Wirtszellen in einem komplexen Modell zu sehen (Caco-2, EMC120B12). Die Humanzellschicht war in den Kontrollen beider Versuche komplett intakt und die Zellen sahen vital aus. Der antimykotische Effekt in einem komplexen Epithelmodell konnte in allen *C. albicans*-Kontrollen bestätigt werden (Caco-2 + *C. albicans*, EMC120B12). Auch hier war die Humanzellschicht komplett intakt, das Pilzwachstum war in einem ersichtlichen Maße gehemmt und kein Eindringen von *C. albicans* in das Gewebe war zu sehen.

Für *C. dubliniensis*-infizierte Gewebemodelle war nach Zugabe der Substanz EMC120B12 ebenfalls eine antimykotische Wirkung zu sehen. Diese äußerte sich



durch Unterschiede im Invasionsverhalten von *C. dubliniensis* in An- und Abwesenheit der Substanz. Nach Zugabe von EMC120B12 sind keine Einschlüsse von Pilzzellen im Gewebe mehr zu finden (Caco-2 + *C. dubliniensis*, EMC120B12), welche in der Infektionskontrolle ohne jegliche antimykotische Substanz zu sehen sind (Caco-2 + *C. dubliniensis*). Auch für die Kontrolle mit einem anderen Antimykotikum konnte der wachstumshemmende Effekt auf *C. dubliniensis* gezeigt werden (Caco-2 + *C. dubliniensis*, Fluconazol). Die Wirksamkeit und Effizienz von EMC120B12 in einem 3D-Hautmodell nach Infektion mit *C. dubliniensis* konnte somit erstmals gezeigt und in mehreren Replikaten reproduziert werden.

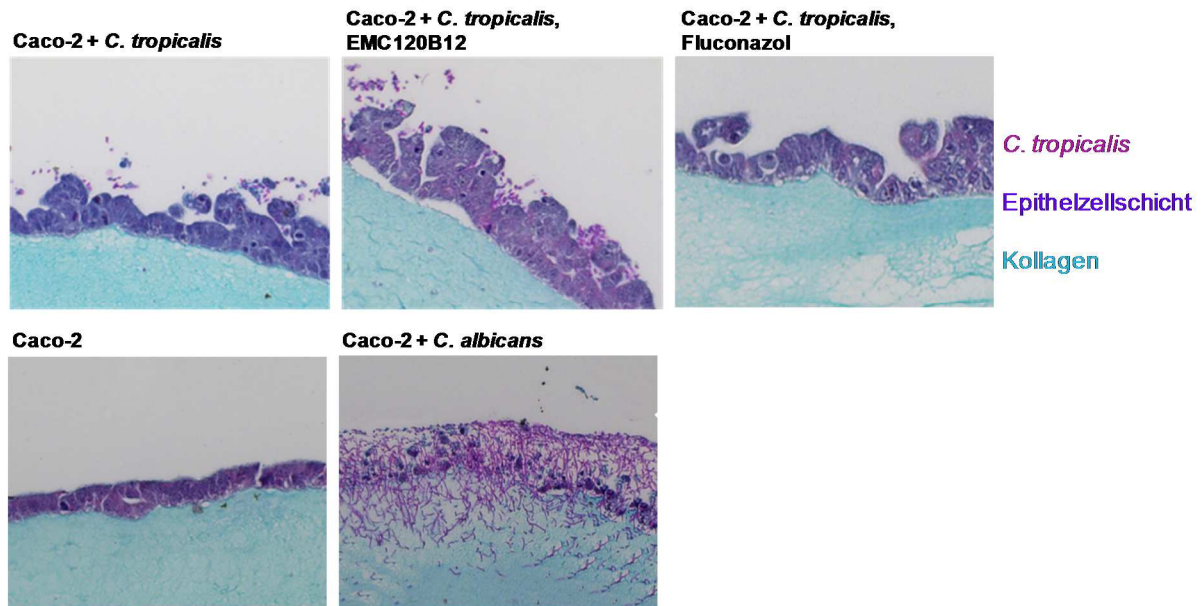
Für *C. tropicalis* war in mehreren Replikaten leider kein eindeutiges Ergebnis reproduzierbar. Hier konnte auch in der Kontrolle von *C. tropicalis* in Abwesenheit der Substanz keine Invasion erkannt werden (Abbildung 22).



**Abbildung 21: Effekt von EMC120B12 in einem *in vitro* 3D-Epithelmodell (Darmepithelzelllinie Caco-2) nach Infektion mit *C. dubliniensis***

Schnitte mit und ohne Infektion mit *C. dubliniensis* und der Applikation von EMC120B12. Mikroskopie von Gewebeschnitten P.A.S. gefärbter *in vitro* 3D-Epithelmodelle zur Untersuchung der Substanz EMC120B12 mit *C. dubliniensis* und der Zelllinie Caco-2. Infektionsdauer 24 h bei 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>. Blau: Kollagen, violett: Caco-2 Zellschicht, pink: *C. dubliniensis*.

Von links nach rechts: **1:** Kontrolle, Infektion von Caco-2 mit *C. dubliniensis*, **2:** Infektion von Caco-2 mit *C. dubliniensis* unter Zugabe von EMC120B12 (IC<sub>50</sub>), **3:** Infektion von Caco-2 mit *C. dubliniensis* unter Zugabe von Fluconazol (MHK 1 µg/ml), **4:** Kontrolle, Caco-2 ohne Infektion, **5:** Kontrolle: Infektion von Caco-2 mit *C. albicans*.



**Abbildung 22: Effekt von EMC120B12 in einem *in vitro* 3D-Epithelmodell (Darmepithelzelllinie Caco-2) nach Infektion mit *C. tropicalis***

Schnitte mit und ohne Infektion durch *C. tropicalis* und der Applikation von EMC120B12. Mikroskopie von Gewebeschnitten P.A.S. gefärbter *in vitro* 3D-Epithelmodelle zur Untersuchung der Substanz EMC120B12 mit *C. tropicalis* und der Zelllinie Caco-2. Infektionsdauer 24 h bei 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>.

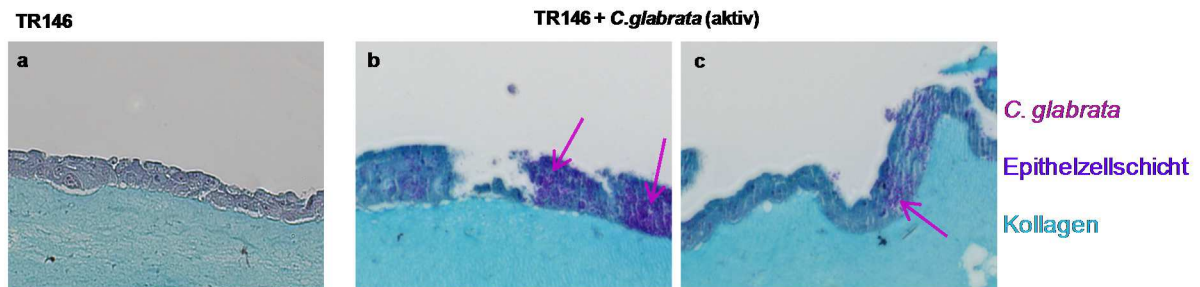
Blau: Kollagen, violett: Caco-2 Zellschicht, pink: *C. tropicalis*.

Von links nach rechts: 1: Kontrolle, Infektion von Caco-2 mit *C. tropicalis*, 2: Infektion von Caco-2 mit *C. tropicalis* unter Zugabe von EMC120B12 (IC<sub>50</sub>), 3: Infektion von Caco-2 mit *C. tropicalis* unter Zugabe von Fluconazol, 4: Kontrolle, Caco-2 ohne Infektion, 5: Kontrolle: Infektion von Caco-2 mit *C. albicans*.

Anschließend wurde der Versuch in gleicher Weise mit *C. glabrata* durchgeführt. Beim AS-HTS-Screening wurde bereits gezeigt, dass *C. glabrata* nicht als Pathogen für den Einsatz im Assay adaptiert werden konnte (siehe 3.3.1). Um zu überprüfen, ob und gegebenenfalls wie *C. glabrata* ohne invasives Hyphenwachstum in innere Gewebeschichten vordringen kann, um Wirtsgewebe zu befallen, wurde ein entsprechender Invasion-Assay angesetzt. Es wurden die Zelllinien Caco-2 und TR146 im 3D-Modell verwendet und mit *C. glabrata* (Can455; Wildtyp) infiziert. Ein Teil der Humanzellen wurde mit hitzeinaktivierten *C. glabrata* Zellen infiziert. Die Inaktivierung erfolgte für 10 Minuten bei einer Temperatur von 100 °C. Dieser Ansatz sollte dazu dienen später unterscheiden zu können, ob dem Eindringen der Pilzzellen in die Hautschicht ein aktiver Vorgang zugrunde liegt, oder ob möglicherweise ein durch das Schneiden der Epithelmodelle entstehendes Artefakt die Ursache für in Zellschicht und Kollagen befindliche Pilzzellen ist. Des Weiteren sollte die mögliche Fähigkeit zur Endozytose der Zelllinie TR146 untersucht werden (Dalle et al., 2010). Es wurde überprüft, ob die Aufnahme der Pilzzellen in die Humanzellen sichtbar gemacht werden kann. Bei mehreren Replikaten konnte *C. glabrata* nicht auf beziehungsweise in den Humanzellschichten gefunden werden.



Die einzige Ausnahme bildete eine Probe, bei der deutlich zu sehen war, dass sich *C. glabrata*-Zellen in den Humanzellen der Zelllinie TR146 befanden. Dies könnte den Membrantransport durch Endozytose widerspiegeln (Abbildung 23b und c) (Brunke und Hube, 2013; Phan et al, 2007; Wächtler et al., 2012).



**Abbildung 23: Mikroskopie von Gewebeschnitten P.A.S. gefärbter *in vitro* 3D-Epithelmodelle mit TR146 Zellen mit und ohne Infektion durch *C. glabrata***

Diese Probe stellte das einzige erfolgreiche Versuchsergebnis dar. Infektionsdauer 24 h bei 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>

**a:** Kontrolle: TR146-Zellen ohne Infektion, **b und c:** Zwei verschiedene Schnitte der Infektion von TR146 mit nicht hitzeinaktivierten *C. glabrata*-Zellen. Nach 24 Stunden befanden sich die *C. glabrata*-Zellen (pink) in den Humanzellen TR146. Die *C. glabrata*-Zellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Im komplexen Gewebemodell konnte somit ebenfalls keine Infektion der Humanzellen mit *C. glabrata* gezeigt werden. Es war kein invasives Verhalten der Pilzzellen und keine Schädigung der Humanzellen erkennbar. Alle mitgeführten Kontrollen zeigten keine Auffälligkeiten. Sie waren identisch zu den mitgeführten Kontrollen bei den bereits beschriebenen Versuchen mit anderen *Candida*-Spezies (Abbildung 23a).

Neben den in dieser Arbeit verwendeten komplexen 3D-Modellen wurden weitere Tests mit EMC120B12 im Nematodenmodell durchgeführt. Dieses noch komplexere System wurde vom Universitätsklinikum Tübingen für diese Zwecke adaptiert und erfolgreich eingesetzt. Auch in diesem Modell konnte der antimykotische Effekt von EMC120B12 eindeutig gezeigt werden (Daten nicht publiziert).

### **3.6 Charakterisierung der Wirkungsweise und des Targets von EMC120B12**

EMC120B12 ist ein neues Benzimidazol-Derivat, dessen antimykotische Aktivität gegen die wichtigsten *Candida*-Spezies und sogar für den hoch resistenten *C. krusei* hier gezeigt werden konnte.

Um die genaue Wirkungsweise und das Target von EMC120B12 zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit zum einen auf Genomebene, mittels Transkriptionsanalysen,

und zum anderen auf biochemischer Ebene, mittels Sterolanalysen, weitere Untersuchungen durchgeführt.

Dazu wurden das Transkriptionsprofil von *C. albicans* und eine detaillierte biochemische Analyse der Sterolmuster von *C. albicans* und *C. krusei* in An- und Abwesenheit von EMC1230B12, Fluconazol und Nocodazol untersucht. Durch die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Versuche wurden *C. albicans* als häufigster pathogener Pilz und *C. krusei* mit seiner intrinsischen Azolresistenz für die weiteren Versuche ausgewählt.

### **3.6.1 Transkriptionsanalysen von *C. albicans* mittels DNA Microarrays**

Zur Aufklärung der genauen Wirkungsweise und zur Verifizierung des genauen Wirkortes von EMC120B12 wurden in dieser Arbeit zunächst Transkriptionsanalysen mittels Mikroarrays durchgeführt. Hierzu wurde ein bereits etablierter DNA-Mikroarray verwendet, welcher 7200 ORFs des Genoms von *C. albicans* abdeckt. Untersucht wurden die Transkriptionsprofile einer *C. albicans* Wildtyp-Kultur (Can14) im exponentiellen Wachstum in An- und Abwesenheit des jeweiligen Wirkstoffes. Dazu wurden EMC120B12 mit 0,4  $\mu$ M, Fluconazol mit 1  $\mu$ g/ml und Nocodazol mit 7,5  $\mu$ g/ml verwendet. Die Profile wurden bei allen folgenden Ergebnissen durch den Vergleich der Veränderungen auf Genomebene nach Zugabe und ohne Zugabe des jeweiligen Wirkstoffes erzeugt.

### **3.6.2 Transkriptionsanalysen von *C. albicans* nach Behandlung mit EMC120B12**

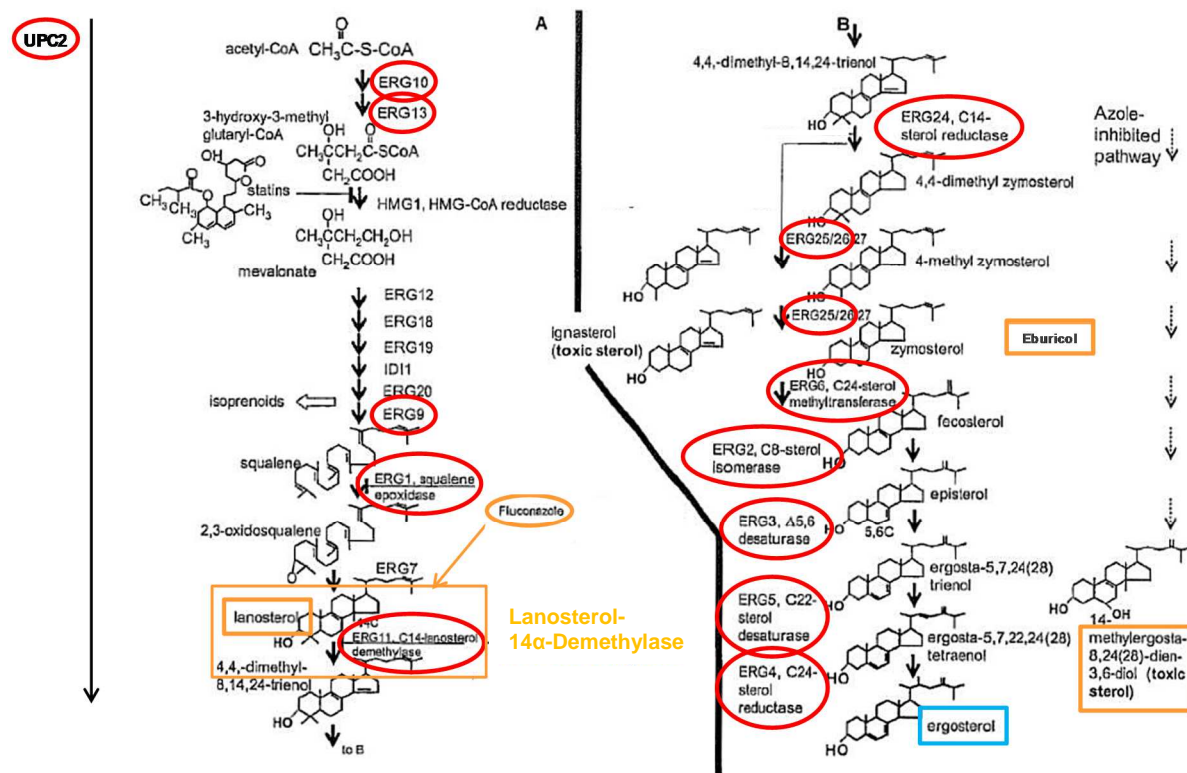
Schon im Vorprojekt zu dieser Arbeit wurden erste Transkriptionsprofile von *C. albicans* in An- oder Abwesenheit von EMC120B12 durchgeführt und signifikant regulierte Gene in *C. albicans* nach einer Behandlung mit EMC120B12 gezeigt. In dieser Arbeit wurden mittels DNA-Microarrays weitere Transkriptionsdaten von *C. albicans* mit dem neuen und unter 3.1 validierten Batch von EMC120B12 ( $IC_{50} = 0,4 \mu$ M) durchgeführt. Der  $IC_{50}$ -Wert und die antimykotische Aktivität des Batches wurden zuvor bestimmt (siehe 3.2) Die Transkriptionsprofile wurden in drei biologischen Replikaten, wie in Kapitel 2.13 beschrieben, durchgeführt. Die Daten wurden wie ebenfalls, wie in diesem Kapitel beschrieben, statistisch ausgewertet. Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Pilzzellen festgestellt werden. In Tabelle 14 sind differenziell exprimierte Gene in

*C. albicans* der drei biologischen Replikate während der Interaktion mit EMC120B12 aufgeführt. Die Ergebnisse für die Substanz EMC120B12 sind zudem in Burger-Kentischer et al., 2011 zu finden. Als differenziell exprimiert wurden Gene angesehen, deren Benjamini-Hochberg angepasster P-Wert durch einen empirisch gemäßigten Bayes t-test 0,001 betrug und mindestens zweifach hoch- oder runterreguliert waren. Die berechneten durchschnittlichen  $\log_2$  Verhältnisse aller betrachteten Gene bewegten sich zwischen -2.39 und 3.79. Diese Werte entsprechen einer 5.25-fachen Regulation nach unten und einer 13.84-fachen Regulation nach oben. Diese Werte sind ebenfalls in Tabelle 14 zu finden. Wie in dieser Tabelle ebenfalls zu sehen, zeigte die Analyse des Transkriptoms, dass hauptsächlich Gene der Ergosterol-Biosynthese durch die Zugabe von EMC120B12 beeinflusst waren. Zudem konnte anhand der signifikant regulierten Gene ein Einfluss auf die Zellwand und die Zellmembran, sowie auf Gene, von denen bekannt ist, dass sie bei Antimykotika-Gabe ihr Transkriptionslevel ändern, beobachtet werden. Das Benzimidazol EMC120B12 ist nach diesen Daten zu urteilen ein potentieller Inhibitor des Ergosterol-Biosynthesewegs. Wie in der Einleitung unter 1.2 bereits beschrieben, ist von der Substanzklasse der Benzimidazole jedoch bekannt, dass sie die Bildung von Tubulin in der Zelle stören und keinerlei Einfluss auf die Ergosterol-Biosynthese haben. Die Ergosterol-Biosynthese ist vor allem für Azole der Angriffspunkt in der Pilzzelle. Um diese Aussagen für Benzimidazole und Azole zu überprüfen und mit den Transkript-Daten für das Benzimidazol EMC120B12 zu vergleichen, wurden Transkriptionsanalysen von *C. albicans* in gleicher Weise wie zuvor mit EMC120B12 auch mit dem Azol Fluconazol und dem Benzimidazol Nocodazol durchgeführt.

### **3.6.3 Transkriptionsanalysen von *C. albicans* nach Behandlung mit Fluconazol**

Um zu bestätigen, dass Azole wie bereits unter 1.2 beschrieben in die Ergosterol-Biosynthese eingreifen und um einen Vergleich zu den erhaltenen Transkriptom-Daten für EMC120B12 zu bekommen, wurden *C. albicans*-Zellen für 3 Stunden mit dem Azol Fluconazol behandelt. Es wurde der für *C. albicans* bekannte MHK-Wert von 1  $\mu\text{g/ml}$  für die Behandlung der Zellen verwendet und anschließend die gelabelte cDNA der behandelten Zellen auf DNA-Microarrays hybridisiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte in drei Replikaten. In den Transkriptomanalysen für Fluconazol konnten signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Pilzzellen

festgestellt werden. Die statistisch ausgewerteten Daten zeigten, dass Gene der Ergosterol-Biosynthese nach Behandlung mit Fluconazol in *C. albicans* differenziell exprimiert waren. Dabei handelte es sich in großer Zahl um Gene der Ergosterol-Biosynthese, welche in den Daten für EMC120B12 ebenso auffällig waren. Eine Zusammenfassung der Daten im Vergleich zu den Daten mit EMC120B12 ist in Tabelle 14 dargestellt. Durch diese Versuche konnte bestätigt werden, dass Fluconazol und EMC120B12 im gleichen Biosyntheseweg, in der Ergosterol-Synthese, interagieren. Diese Interaktion beider Wirkstoffe in die Ergosterol-Biosynthese ist in Abbildung 24 veranschaulicht.



**Abbildung 24: Ergosterol-Biosynthese mit relevanten Zwischenprodukten und Enzymen**

Verändert nach Akins 2005, Medical Mycology, 43, 285-318 und angepasst auf die Mikroarray-Ergebnisse dieser Arbeit nach Behandlung der Pilzzellen mit EMC120B12 und Fluconazol.

**Blau:** Endprodukt des Syntheseweges, wenn keine Störung der Synthese stattfindet.

**Rot:** Hochregulierte Gene nach Zugabe von EMC120B12. Diese Ergebnisse sind den Ergebnissen der Mikroarrays nach einer Behandlung der Fluconazol sehr ähnlich.

**Orange:** Inhibition der Lanosterol-14α-Demethylase durch Azolzugabe und entstehende Produkte.

### **3.6.4 Transkriptionsanalysen von *C. albicans* nach Behandlung mit Nocodazol**

Mit dem Benzimidazol Nocodazol (7,5 µg/ml) wurden Analysen des Transkriptom von *C. albicans* in gleicher Weise wie für EMC120B12 und Fluconazol durchgeführt. Dadurch sollte die, wie unter 1.2 beschrieben, bekannte Wirkungsweise von Benzimidazolen bestätigt und zudem überprüft werden, ob auch in den Transkriptom-Daten ein Einfluss auf die Mikrotubuli und dadurch auf die Zellteilung gezeigt werden kann. Laut Literatur sollte keine Interaktion von Nocodazol mit dem Ergosterol-Biosyntheseweg stattfinden und die Gene dieser Biosynthese nicht betroffen sein. Mit diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob die Wirkungsweise des Benzimidazol EMC120B12 und des Benzimidazol Nocodazol in irgendeiner Weise auf Genomebene ähnlich sind.

Beim Versuch mit Nocodazol zeigten mehrere technische Replikate eindeutig, dass Gene, die in Assoziation mit den Mikrotubuli stehen, durch die Behandlung mit Nocodazol im Vergleich zu einer unbehandelten Probe differenziell exprimiert waren. Bei keinem Gen, das mit dem Ergosterol-Biosyntheseweg in Verbindung zu bringen ist, konnte im Vergleich zur unbehandelten Probe nach der statistischen Auswertung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Werte sind in Tabelle 14 zu finden. Die mit Nocodazol erhaltenen Ergebnisse konnten anschließend mit den zuvor durchgeführten Transkriptomanalysen von *C. albicans* in Anwesenheit von EMC120B12 und mit den Daten nach Behandlung mit Fluconazol verglichen werden.

### **3.6.5 Zusammenfassung und Vergleich der Transkriptionsanalysen von *C. albicans* nach Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen**

Die Zusammenfassung und Übersicht aller Daten der Transkriptionsanalysen für die verwendeten Wirkstoffe ist in Abbildung 25 dargestellt. Die signifikanten Daten für Nocodazol sind im Vergleich zu den Daten von EMC120B12 und Fluconazol in Tabelle 14 aufgeführt. Die Ergebnisse verifizierten die Microarray-Daten der EMC120B12 behandelten Zellen und brachten die Charakterisierung der neuen antimykotischen Substanz weiter voran. Nocodazol, ein anderes Benzimidazol, zeigt im Gegensatz zu EMC120B12 auf Transkriptebene keine Interaktion mit dem Ergosterol-Biosyntheseweg und induziert die Störung der Bildung von Tubulin. Dies bestätigt, dass sich EMC120B12, bezogen auf den Wirkort, nicht wie ein Benzimidazol verhält und ein Inhibitor in der Ergosterol-Synthese ist. An welcher Stelle diese Inhibition im

Ergosterol-Syntheseweg durch EMC120B12 stattfindet und welche Enzyme im Syntheseweg genau betroffen sind, wurde im Folgenden mit weiteren Versuchen überprüft. EMC120B12 hat auf Transkriptionsebene keinen Einfluss auf die Mikrotubuli und zeigt ein ähnliches Ergebnis wie das Azol Fluconazol. Nach Zugabe von Fluconazol zeigten die Transkriptionsprofile eine sehr hohe Übereinstimmung zu den Profilen nach Zugabe von EMC120B12. In beiden Fällen waren Gene, die für Enzyme der Ergosterol-Biosynthese kodieren, am stärksten induziert. Insgesamt 13 Gene, die direkt in den Syntheseweg involviert sind, sowie der Transkriptionsfaktor UPC2 wurden in Zellen des *C. albicans* Wildtyps Can14 nach Inkubation mit EMC120B12 und nach Inkubation mit Fluconazol fast gleich stark induziert. Für alle diese Gene konnte keine Änderung in der Expression nach Inkubation mit Nocodazol beobachtet werden. Vergleicht man die Ergebnisse von EMC120B12 und Fluconazol mit denen des Benzimidazols Nocodazol zeigen diese eindeutig einen anderen Wirkort in der Pilzzelle. Bei allen Proben und Wirkstoffen konnten Gene gefunden werden, die als allgemeine Reaktion auf Antimykotika hochreguliert wurden, sowie Gene, die für die Zellwand- und Zellmembran-Biogenese in Verbindung gebracht werden. Diese Daten, mit einem Vergleich aller Ergebnisse der Transkriptionsprofile, sind ebenfalls in Tabelle 14 zu finden. Die gesamten Daten der Transkriptionsprofile dieser Arbeit können unter der GEO-Zugangsnummer: GSE64976 eingesehen werden. Im Anhang ist beispielhaft ein aufgearbeiteter Datensatz für EMC120B12 aufgeführt. Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse auf Transkript-Ebene wurde im Weiteren ein Vergleich von EMC120B12 mit Nocodazol und Fluconazol auf visueller Ebene mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt.

**Tabelle 14: Vergleich der Genexpression von *C. albicans* SC5314 nach Behandlung mit EMC120B12, Fluconazol und Nocodazol**

Die Daten basieren auf Transkriptionsanalysen mittels Mikroarrays. Aufgelistet sind die differentiell exprimierten Gene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanz bei einem adjusted P value  $\leq 0.05$ . Positiver Wert: mRNA-Level höher als der in der Kontrolle. Negativer Wert: mRNA-Level niedriger als in der Kontrolle (Verändert nach Keller et al., 2015).

Gengruppe und Gene	EMC120B12		Fluconazol		Nocodazol	
	Fold expression	Adjusted P value	Fold expression	Adjusted P value	Fold expression	Adjusted P value
<b>Ergosterol-Biosynthese</b>						
<i>ERG1</i>	4.34	0.0001	4.76	0.0007	-1.07	0.4709
<i>ERG2</i>	2.96	0.0068	2.82	0.1655	1.10	0.3781
<i>ERG3</i>	6.95	<0.0001	4.52	0.0070	-1.66	0.0131
<i>ERG4</i>	3.08	0.0014	2.16	0.0181	-1.01	0.9403

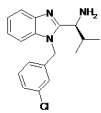
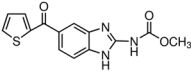
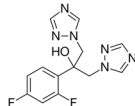
<i>ERG5</i>	3.05	0.0001	2.21	0.0263	-1.04	0.6648
<i>ERG6</i>	11.36	<0.0001	8.34	0.0007	-1.19	0.2257
<i>ERG10</i>	2.60	0.0009	2.05	0.0362	-1.20	0.0145
<i>ERG11</i>	8.41	<0.0001	5.02	0.0024	-1.12	0.1592
<i>ERG13</i>	4.91	<0.0001	3.32	0.0074	-1.11	0.1258
<i>ERG24</i>	3.32	0.0016	2.83	0.0033	1.01	0.8406
<i>ERG25</i>	2.64	0.0002	2.82	0.0070	1.02	0.7591
<i>ERG251</i>	4.66	<0.0001	4.90	0.0025	-1.37	0.0008
<i>ERG26</i>	2.09	0.0002	2.25	0.0061	-1.03	0.7119
<i>UPC2</i>	3.47	0.0002	4.31	0.0024	1.14	0.1577

### Reaktion auf Antimykotika

<i>CHT2</i>	-3.90	<0.0001	-5.34	0.0007	-11.51	<0.0001
<i>CRH11</i>	2.02	0.0069	1.74	0.2978	-1.13	0.2070
<i>CSH1</i>	2.12	0.0055	1.75	0.5433	2.24	0.0002
<i>DDR48</i>	13.84	<0.0001	12.31	0.0070	1.64	0.0025
<i>FRP1</i>	2.01	0.0008	1.57	0.3109	1.55	0.0004
<i>FTH1</i>	2.03	0.0005	2.21	0.0235	1.66	0.0008
<i>HYR1</i>	2.72	0.0038	1.92	0.2725	-2.32	0.0001
<i>NHP6A</i>	-2.04	0.0014	-1.34	0.9995	-2.32	<0.0001
<i>orf19.6688</i>	-3.39	0.0001	-3.00	0.1915	-4.24	<0.0001
<i>orf19.7504</i>	2.46	0.0077	4.11	0.0024	1.07	0.3812
<i>PGA7</i>	2.46	0.0005	1.53	0.6487	1.49	0.0045
<i>PHR2</i>	4.38	0.0001	5.22	0.0362	1.21	0.1683
<i>POL30</i>	-2.00	0.0069	-2.68	0.0007	-1.20	0.0336
<i>RTA2</i>	4.18	0.0003	5.31	0.0024	2.23	0.0009

### Andere Funktionen

<i>HTA2</i>	-2.32	0.0038	-3.16	0.0021	-2.90	<0.0001
<i>MAL2</i>	-2.96	0.0002	-2.62	0.2452	-1.72	0.0013
<i>MAL31</i>	-2.75	0.0038	-1.96	0.3062	-1.61	0.0130
<i>orf19.2125</i>	3.12	0.0002	3.60	0.0048	-1.15	0.2970
<i>orf19.4476</i>	2.34	0.0077	2.42	0.0303	3.51	0.0001
<i>orf19.5799</i>	2.59	<0.0001	3.47	0.0070	1.54	0.0007
<i>orf19.6840</i>	2.43	0.0003	3.29	0.0172	-1.01	0.9456
<i>orf19.7455</i>	3.07	0.0002	4.80	0.0389	-1.03	0.8849
<i>orf19.90</i>	2.93	0.0006	2.79	0.0953	-1.37	0.0081
<i>PGA23</i>	5.50	<0.0001	2.94	0.0070	-4.36	<0.0001
<i>PGA26</i>	-3.35	0.0003	-3.11	0.6235	-3.80	<0.0001
<i>PST3</i>	2.10	<0.0001	1.84	0.1448	1.30	0.0254
<i>RBT1</i>	-2.63	0.0002	-2.70	0.1294	-1.37	0.0026
<i>SET3</i>	3.19	<0.0001	3.25	0.0151	-1.1	0.2382
<i>ARO10</i>	-5.25	0.0007	-3.66	0.0626	-6.96	<0.0001
<i>CDG1</i>	-2.04	0.0003	-1.78	0.3509	-3.09	<0.0001
<i>CHA1</i>	-2.46	0.0007	-1.87	0.3062	-3.00	<0.0001

Gene Substanz	Ergosterol- Synthese	Mikrotubuli assoziiert
	 <b>EMC120B12</b> 0,4 µM <b>Benzimidazol</b>	<b>hoch-reguliert</b>
 <b>Nocodazol</b> 7,5 µg/ml <b>Benzimidazol</b>	-	<b>hoch-reguliert</b>
 <b>Fluconazol</b> 0,5 µg/ml <b>Azol</b>	<b>hoch-reguliert</b>	-

**Abbildung 25: Zusammenfassung der Daten der Transkriptionsanalysen für alle verwendete Wirkstoffe**

Das Benzimidazol EMC120B12 verhält sich wie ein Azol. Die Gene der Ergosterol-Biosynthese sind hochreguliert. Benzimidazole haben normalerweise Einfluss auf die Mikrotubuli. Das Benzimidazol Nocodazol zeigt wie erwartet einen Einfluss auf diese Gene (Quelle Strukturformeln: sigmaaldrich.com, wikipedia.org).

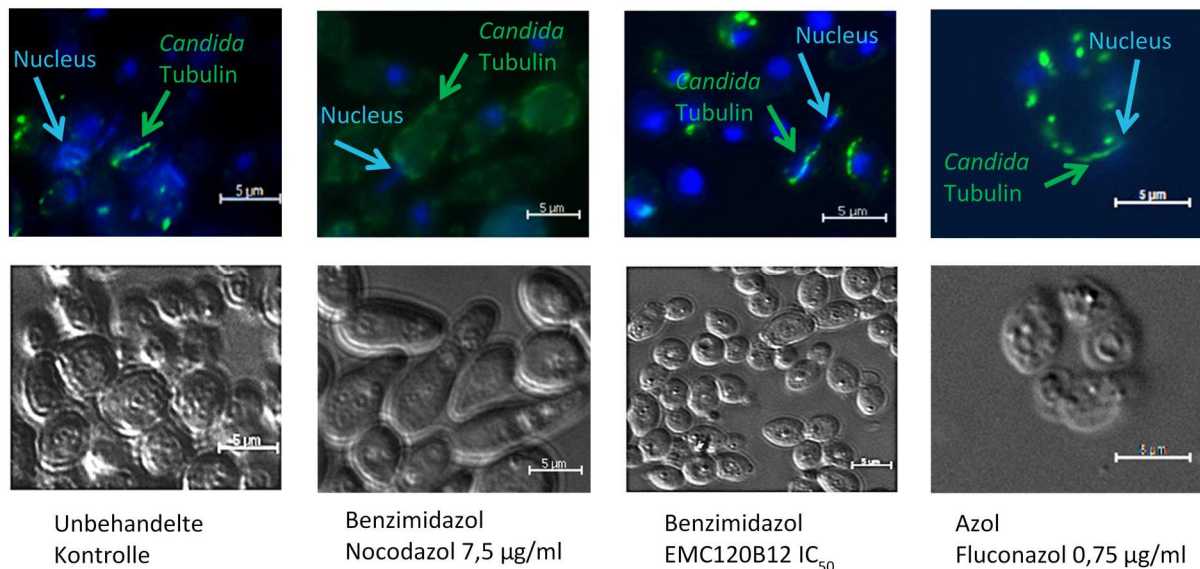
### 3.7 Immunfluoreszenz von *C. albicans* Tubulin

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Transkriptionsanalysen und für ein visuelles Ergebnis in der Zelle, wurden Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt. Diese Aufnahmen zeigen, dass auch auf biochemischer Ebene keine Interaktion von EMC120B12 mit den Mikrotubuli zu sehen ist. Hierfür wurde das Tubulin in *C. albicans*-Zellen durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Als erster Antikörper wurde ein *C. albicans*-Tubulin spezifischer Antikörper eingesetzt, dessen Bindung an Tubulin durch einen zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper (Alexa288) unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wird. Intakte Tubulinspindeln sind dadurch unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Als Kontrolle für die erfolgreiche Aufarbeitung der Proben, wurden die Nuklei der Zellen mit DAPI angefärbt. In Abbildung 26 ist das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt. Bei allen Proben war die DAPI-Färbung erfolgreich. Die Nuklei waren bei allen Proben, egal mit welchem Antimykotikum behandelt und bei der unbehandelten Kontrolle, zu sehen. Die hellblauen Pfeile kennzeichnen die erfolgreich angefärbten Zellkerne in den einzelnen Proben. Wichtig ist zudem, dass die DAPI-Färbung bei allen Proben gleich aussieht, da diese als interne Kontrolle für den Versuch dient. Auch dies war bei allen Proben gewährleistet und ist aus der Abbildung 26 ersichtlich. Intaktes Tubulin ist durch die Antikörperfärbung gut zu erkennen und zeichnet sich durch hell leuchtende Spindelapparate aus. Tubulin ist in allen Proben durch grüne Pfeile gekennzeichnet. In der unbehandelten Kontrolle war das Tubulin eindeutig und gut erkennbar in der



Zelle zu sehen. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Fluoreszenzaufnahmen von EMC120B12 behandelten Zellen ist kein Unterschied zu erkennen. Das Tubulin liegt ebenso wie bei der unbehandelten Probe in intakter Form vor und zeigt keine Beeinträchtigung durch das Benzimidazol EMC120B12. Hiermit konnte nicht nur auf der Transkriptebene, sondern auch auf Proteinebene eindeutig gezeigt werden, dass EMC120B12 Tubulin und damit die Mikrotubuli nicht beeinflusst oder diese für das Benzimidazol-Derivat als Angriffspunkt dienen. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen Konzentrationen an EMC120B12 auf gleiche Weise wiederholt und für jede Probe konnte das gleiche reproduzierbare Ergebnis gezeigt werden. Das Tubulin ist nach einer Behandlung mit EMC120B12 noch immer intakt.

Alexa 488: *Candida* Tubulin DAPI: Nuclei



**Abbildung 26: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *C. albicans* Tubulin**

Aufnahmen nach Zugabe verschiedener Wirkstoffe im Vergleich dazu unbehandelte Pilzzellen ohne Zugabe von Wirkstoffen.

**Von links nach rechts:** Unbehandelte Kontrolle, Probe nach Inkubation mit Nocodazol (7,5 µg/ml), Probe nach Inkubation mit EMC120B12 (IC<sub>50</sub>) und Probe nach Inkubation mit Fluconazol (0,75 µg/ml).

**Obere Reihe:** Fluoreszenzaufnahmen der Proben. In Blau sind die Nuclei nach einer DAPI-Färbung zu erkennen. In Grün sind Tubulinstrukturen zu erkennen. Markierung durch einen mit einem Antikörper gekoppelten Farbstoff (Alexa488).

**Untere Reihe:** DIC-Aufnahmen der gleichen Proben zur Kontrolle.

Das gleiche Ergebnis konnte bei Zellen gezeigt werden, die mit Fluconazol behandelt wurden. Die Tubulin-Färbung wurde auf gleiche Weise wie für EMC120B12 durchgeführt und es wurden ebenfalls mehrere Konzentrationen verwendet, die alle das gleiche Ergebnis zeigten. Nach einer Behandlung mit Fluconazol, war das Tubulin intakt und es war kein Unterschied zur unbehandelten Probe zu erkennen. Dies zeigt, dass Fluconazol und EMC120B12 sowohl auf Transkriptebene, wie durch die

Mikroarray-Experimente ersichtlich, als auch auf Proteinebene nicht mit den Mikrotubuli und den Zellspindeln interagieren.

Der Versuch wurde ebenfalls unter gleichen Bedingungen mit dem Benzimidazol Nocodazol durchgeführt. Nach der Inkubation der Zellen mit Nocodazol waren keine klaren Tubulinstrukturen mehr zu erkennen. Was aus der Literatur für Benzimidazole bekannt ist und zuvor auf Transkriptebene gezeigt wurde, konnte somit auch auf Protein-Ebene mit den Immunofluoreszenz-Aufnahmen bestätigt werden.

Das Benzimidazol Nocodazol stört die Bildung von Tubulin. Im Gegensatz dazu hat EMC120B12 keinen Einfluss auf die Mikrotubuli-Bildung. Dies bestätigt, dass sich EMC120B12 bezogen auf den Wirkort nicht wie ein Benzimidazol verhält, sondern dass es, wie das Azol Fluconazol, ein Inhibitor der Ergosterol-Synthese ist.

Um genauere Aussagen zum Wirkort von EMC120B12 zu erhalten, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Sterolanalysen durchgeführt.

### **3.8 GC/MS-Analysen der Sterolmuster von *Candida* spp. zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von EMC120B12**

Zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von EMC120B12 wurden im Anschluss an die Transkriptionsanalysen von *C. albicans* detaillierte biochemische Analysen der Sterolzusammensetzung mittels GC/MS durchgeführt. Die Zielenzyme lassen sich durch Inkubation eines Pathogens mit einem potentiellen Wirkstoff und durch die anschließende Analyse der Veränderungen der Sterolzusammensetzung des Pathogens effizient identifizieren. Für diese Sterolanalytik wurden in der weiteren Arbeit zum einen der häufigste humanpathogene Pilz *C. albicans* und zum anderen *C. krusei* verwendet. *C. krusei* zeichnet sich durch seine Resistenz gegen Azole aus und lieferte in den bisherigen Versuchen interessante Ergebnisse. Durch die Sterolanalysen können Veränderungen der Sterolzusammensetzung nach Zugabe von EMC120B12, Fluconazol und Nocodazol im Vergleich zu unbehandelten Proben gezeigt und auch untereinander verglichen werden. Dies ist insbesondere an den Stellen der Ergosterol-Biosynthese interessant, bei denen auch auf Transkriptebene eine Veränderung der Transkriptmenge gezeigt werden konnte. Diese Veränderungen und dabei insbesondere die Anreicherung von Vorstufen und von Sterolen, die vom normalen Syntheseweg abweichen, wurden auf der Transkriptebene und durch die

Sterolanalysen detektiert und miteinander verglichen. So soll das Zielenzym oder sollen die Zielenzyme von EMC120B12 genau identifiziert werden.

### 3.8.1 Stammauswahl für die Sterolanalytik

Die Stammauswahl für die GC/MS-Analysen erfolgte über die MHK-Ergebnisse, die unter 3.4 zu finden sind. Hier wurden etwa 50 Stämme getestet und die MHK-Werte bestimmt. Für die weitere Arbeit wurde aus diesen Stämmen ein Set an resistenten und sensitiven *C. albicans* und *C. krusei* ausgewählt und in der Sterolanalytik verwendet. *C. krusei* zeigt in den MHK-Versuchen ein sehr interessantes Verhalten und reagiert auf EMC120B12 sensitiv. EMC120B12 agiert auf Transkript- sowie Zellebene wie bereits gezeigt wie ein Azol. Da *C. krusei* eine intrinsische Resistenz gegen Azole besitzt und auf EMC120B12 reagiert, soll ein *C. krusei*-Isolat als resistenter Stamm gegen Fluconazol und gleichzeitig sensitiver Stamm gegen EMC120B12 in den weiteren Versuchen näher betrachtet werden. In der weiteren Arbeit wurden daher ein sensitiver *C. albicans*-Stamm, der Wildtyp SC5314 und ein resistentes *C. albicans*-Isolat, Can741, sowie ein *C. krusei* Wildtyp zur Aufklärung des Wirkortes von EMC120B12 verwendet. Bei diesen Stämmen sollen mittels GC/MS-Analyse die akkumulierenden Sterole nach Behandlung mit einem Antimykotikum identifiziert werden. Die Sterolzusammensetzung soll Aufschluss über das exakte Ziel von EMC120B12 in der Zelle geben. Zudem sollen die Unterschiede zwischen Fluconazol und EMC120B12 näher geklärt werden. Um die Unterschiede zwischen beiden Wirkstoffen zu klären, sollen die Sterolmuster mittels GC/MS-Messungen untersucht werden. Die Sterole werden durch den Vergleich der Massen und der relativen Retentionszeiten eindeutig identifiziert. Über die akkumulierenden Sterole kann auf die durch eine Substanz inhibierten Enzyme rückgeschlossen werden. Für die Korrelation der MS-Daten und der Struktur der einzelnen Sterole wurden Daten von synthetisierten Sterolen des Labors von Bracher (LMU München), der NIST<sup>TM</sup>-Datenbank und Daten aus der Literatur, wie unter Müller et al., 2013 beschrieben, verwendet.

In den folgenden Kapiteln sind die akkumulierenden Sterole der einzelnen Versuche aufgeführt. In Abbildung 36 ist zusammenfassend der Ergosterol-Biosynthese unter Inhibition des Enzyms Erg11p mit den aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen dargestellt.

### 3.8.2 Optimierung der Auswertungsmethodik der GC/MS-Daten zur Sterolanalyse

Die vergleichenden Analysen auf Genomebene mittels Mikroarrays zeigten, dass viele Gene der Ergosterol-Biosynthese durch EMC120B12 und durch Fluconazol betroffen sind. Dieser Syntheseweg stellt in der Zelle eindeutig den Angriffspunkt der beiden Antimykotika dar. Zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus des Benzimidazols EMC120B12, wurden über einen biochemischen Ansatz die Sterolmuster der ausgewählten *Candida*-Isolate in An- und Abwesenheit verschiedener antimykotischer Substanzen analysiert und miteinander verglichen.

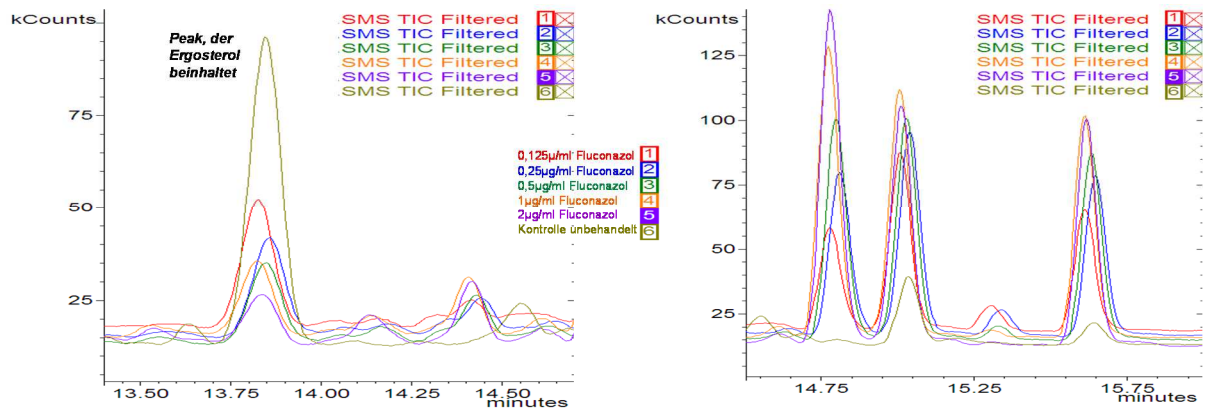
Hierfür wurden mittels GC/MS-Analysen die akkumulierenden Sterole in der Zelle gemessen. Die Zusammensetzung der Sterole lässt Rückschlüsse auf den genauen Wirkort und das betroffene Enzym in der Ergosterol-Biosynthese schließen. Um das genaue Zielenzym von EMC120B12 zu identifizieren wurde sein inhibitorischer Effekt auf den Ergosterol-Biosyntheseweg analysiert. Beim biochemischen Prozess der Synthese des Endprodukts, dem Ergosterol, sind viele Enzyme beteiligt. In Tabelle 1 ist eine Übersicht wichtiger Enzyme der Ergosterol-Biosynthese unter Angabe der kodierenden Gene aufgeführt.

Zu Beginn wurden sowohl mit Fluconazol als auch mit EMC120B12 jeweils fünf verschiedene Konzentrationen und eine unbehandelte Kontrolle getestet und anhand der daraus resultierenden Chromatogramme ausgewertet. Als Referenz wurde in allen Proben dieser Arbeit Cholestan verwendet. In Abbildung 29 wurden in einer ersten Darstellung der GC/MS-Daten die Rohdaten von fünf mit Fluconazol behandelten Proben und einer Kontrolle als Chromatogramme direkt nach GC/MS-Messung überlagert. Bereits auf den ersten Blick lassen sich Unterschiede zwischen den mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen behandelten Proben erkennen.

In Abbildung 28 ist die Darstellung der GC/MS-Daten nach weiterführender Aufarbeitung der Rohdaten durch Extraktion der Qualifier Ionen (*Qualifier Ions*) zu sehen. Dies ist nötig, da oft ein Peak mehrere Ionen mit verschiedenen Massen enthält und die Peakhöhe der Rohdaten nicht immer äquivalent zur Menge des akkumulierenden Sterols ist. Andere im Peak verdeckte Sterole beeinflussen ebenso die Peakhöhe. Durch das Extrahieren der Ionen wird die Basislinie geglättet und störende Hintergrundsignale werden vermindert. Trotzdem ist jedes Sterol eindeutig durch diese Ionen identifizierbar. Die Peaks sind nach der Aufarbeitung nun direkt

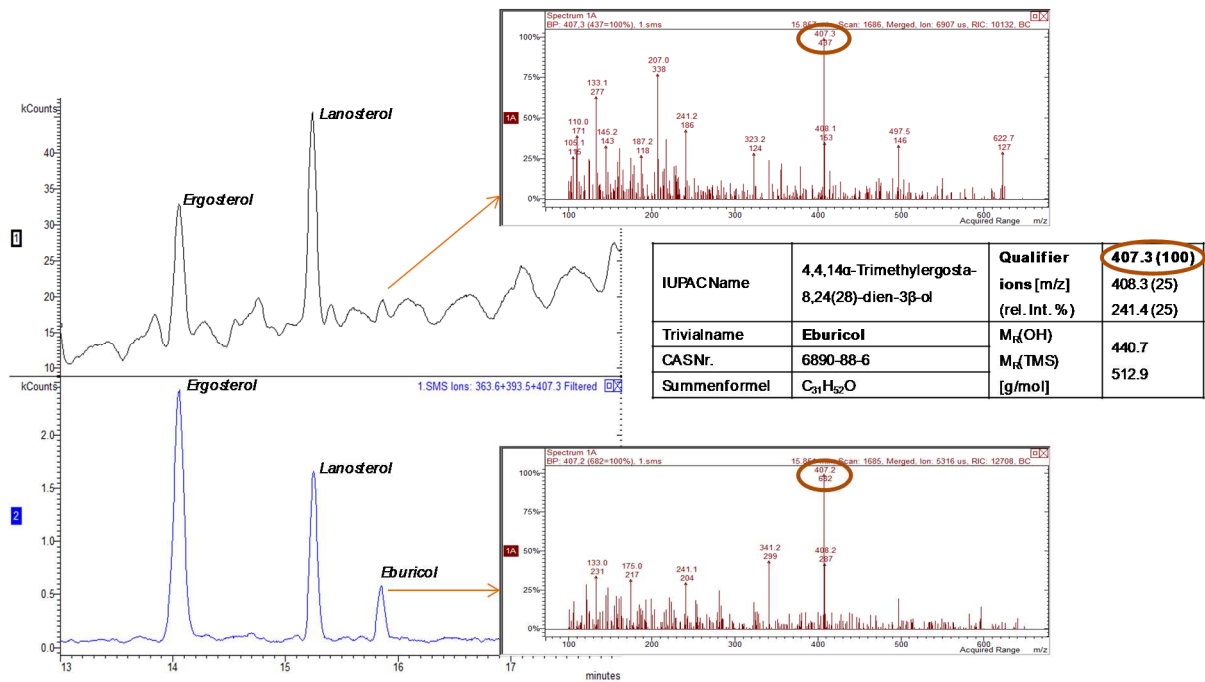
proportional zu der Menge des jeweiligen Sterols. In Abbildung 28 ist dies für Eburicol gezeigt. Dieses Sterol ist in der gezeigten Probe durch die Aufarbeitung eindeutig identifizierbar.

Das genaue Verfahren der Extraktion der Qualifier Ionen für eine verbesserte relative Quantifizierung der akkumulierenden Sterole wurde bereits im Kapitel Material und Methoden unter 2.15 beschrieben.



**Abbildung 27: Darstellung von GC/MS-Daten akkumulierender Sterole ohne weiterführender Aufarbeitung der Rohdaten durch Extraktion der Qualifier Ionen**

Sechs Chromatogramme nach sechs GC/MS-Messung wurden in der Darstellung überlagert. Zu sehen: Akkumulierende Sterole von *C. albicans* WT-Proben (Can14) nach Behandlungen mit Fluconazol in verschiedenen Konzentrationen, sowie eine unbehandelte Kontrolle. Der erste Peak beinhaltet Ergosterol. Die wirkliche Peakhöhe und damit Ergosterolmenge der Probe ist ohne Aufarbeitung nicht korrekt darstellbar.



**Abbildung 28: Extraktion der Qualifier Ionen für eine verbesserte relative Quantifizierung der akkumulierenden Sterole am Beispiel von Eburicol**

Für Eburicol ist die Hauptmasse m/z 407,3. Über diese Masse in Kombination mit der relativen Retentionszeit (RRT) ist Eburicol eindeutig identifizierbar.

Aus diesen ersten Versuchen war ersichtlich, dass drei Konzentrationen an Wirkstoff für eine optimale Darstellung der Unterschiede zwischen den Proben ausreichend sind. Im weiteren Verlauf der Auswertungen wurden somit drei Konzentrationen gezeigt. Der interne Standard Cholestan wurde in jeder Probe mitgeführt. Dieser Standard wurde in jeder Messung kontrolliert und konnte in jeder Probe in etwa gleichen Mengen nachgewiesen werden. Daher wird der Peak in weiteren Auswertungen nicht weiter gezeigt. Für jedes Sterol in jeder Probe wurden im weiteren Verlauf der Arbeit für eine bessere Darstellung die Qualifier Ionen extrahiert.

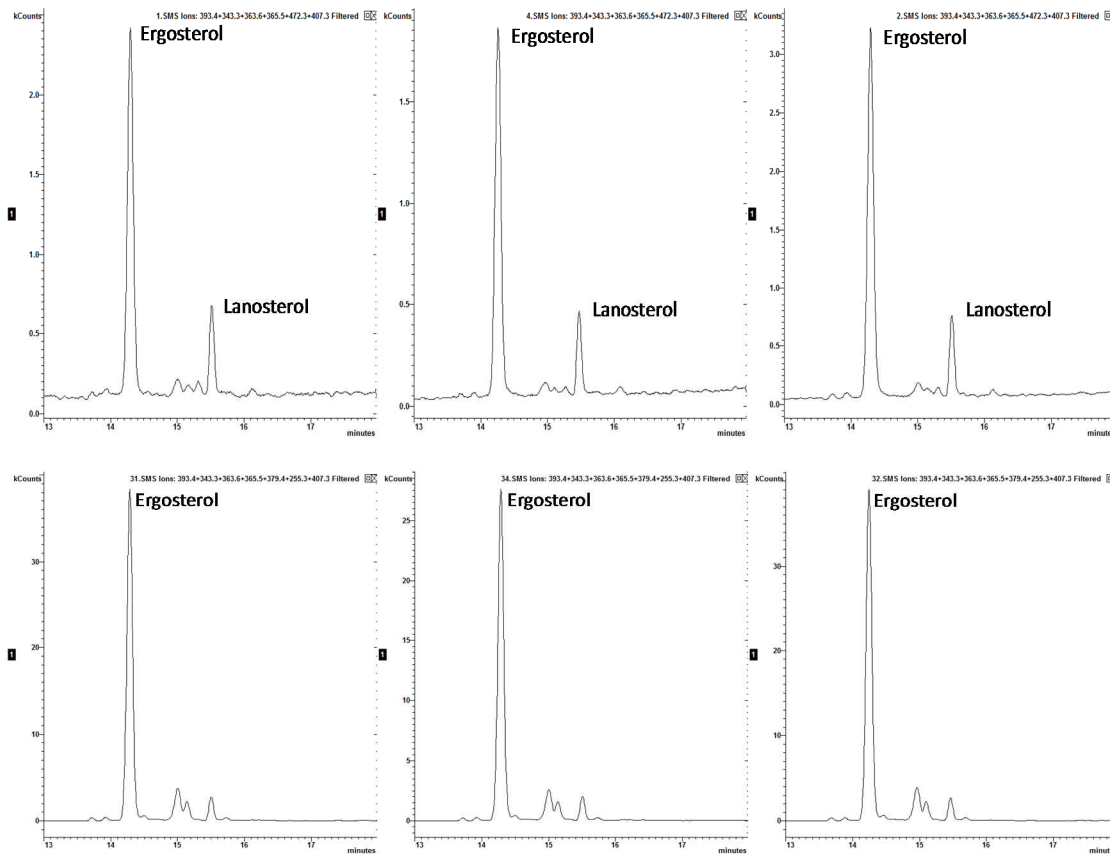
### 3.8.3 Sterolanalysen von *C. albicans* und *C. krusei* mit optimierter Auswertung der Ergebnisse

Durch die Optimierung der Auswertung konnten die erhaltenen Steroldaten von *C. albicans* und *C. krusei* nach Inkubation mit EMC120B12 optimal mit den Ergebnissen ohne Zugabe von Wirkstoff und mit den Ergebnissen nach Inkubation mit Fluconazol und Nocodazol verglichen werden. Die einzelnen Ergebnisse dazu sind in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

### 3.8.3.1 Sterolanalysen von *C. albicans* und *C. krusei* mit Nocodazol zur Validierung der eingesetzten GC/MS-Methode

Zur Validierung der Methode wurden zunächst Sterolanalysen der *Candida*-Isolate mit Antimykotika durchgeführt, welche andere Angriffspunkte als die Ergosterol-Biosynthese in der Pilzzelle haben. In Abbildung 29 sind die Sterolmuster von *C. albicans* und *C. krusei*, die mit dem Benzimidazol-Derivat Nocodazol (7,5 µg/ml) behandelt wurden, gezeigt. Wie erwartet zeigt das Benzimidazol Nocodazol keinen Effekt auf den Post-Lanosterol-Weg der Biosynthese bei beiden Organismen. Nach einer dreistündigen Inkubation der Pilzzellen mit Nocodazol sind sowohl bei *C. albicans* als auch *C. krusei* die Sterole Ergosterol, Lanosterol sowie kleine Mengen von Vorstufen und Zwischenprodukte der Synthese des Ergosterol, eindeutig detektierbar. Es gibt keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Diese Proben zeigen, wie aus der Literatur bekannt und den vorangegangenen Transkriptionsanalysen und Immunfluoreszenzaufnahmen nachgewiesen, dass Nocodazol keinen Einfluss auf die Ergosterol-Synthese hat und, dass hier auch auf Sterolebene keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen sind.

Durch diese Vorversuche konnte eindeutig gezeigt werden, dass die GC/MS-Analyse zur Detektion der Sterolmuster in *Candida* spp. geeignet ist und Sterolanalysen zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von EMC120B12 verwendet werden können. Zudem konnten die zuvor erhaltenen Ergebnisse zu Nocodazol bestätigt werden.



**Abbildung 29: Sterolmuster von *C. albicans* und *C. krusei* nach Behandlung mit dem Benzimidazol-Derivat Nocodazol**

**Oben:** *C. albicans* Wildtyp SC5314 (Can14) mit Nocodazol behandelt, Inkubation 3 h.

Can14 unbehandelt (links), Can14 mit 7,5 µg/ml Nocodazol (Mitte),

Can14 mit 128 µg/ml Nocodazol (rechts).

**Unten:** *C. krusei* WT mit Nocodazol behandelt, Inkubation 3h.

*C. krusei* unbehandelt (links), *C. krusei* mit 7,5 µg/ml Nocodazol (Mitte), *C. krusei* mit 128 µg/ml

Nocodazol (rechts). Das Endprodukt der Ergosterol-Biosynthese ist eindeutig identifizierbar. Nocodazol hat keinen Einfluss auf die Synthese von Ergosterol. Die Ergebnisse der behandelten Proben sehen aus wie die unbehandelte Kontrolle.

### 3.8.3.2 Sterolanalysen von *C. albicans* nach Behandlung mit Fluconazol und EMC120B12 zur Aufklärung des Wirkortes von EMC120B12

Für die Sterolanalysen von *C. albicans* wurde der gegen Fluconazol und EMC120B12 sensitive Stamm SC5314 (Can14) und das Fluconazol-resistente Isolat Can741 ausgewählt.

Die beiden Wirkstoffe Fluconazol und EMC120B12 greifen, wie in den bisherigen Ergebnissen gezeigt, in die Ergosterol-Biosynthese ein. Wie unter 1.2 beschrieben, führt der Einsatz eines Ergosterol-Biosynthese-Inhibitors bei einer Hemmung der Lanosterol-Demethylase zu einer Akkumulation von Ergosterol-Vorstufen, wie Lanosterol, und zu abweichenden Sterolformen, wie 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Für Fluconazol ist die Hemmung der Lanosterol-Demethylase bekannt



(Martel et al., 2010). Im Weiteren sollen die akkumulierenden Sterole überprüft werden. Für EMC120B12 kann durch die Akkumulation der Sterole ebenfalls gezeigt werden, welche Enzyme durch EMC120B12 inhibiert werden. Zudem können die Sterolmuster mit den Daten des Benzimidazols Nocodazol aus 3.8.3.1 verglichen werden. Die Sterolmuster zu Nocodazol bestätigen, dass Benzimidazole normalerweise nicht im Ergosterol-Biosyntheseweg interagieren.

Die Chromatogramme A1-A3 in Abbildung 30 zeigen den Effekt von Fluconazol und EMC120B12 auf den Azol-sensitiven und EMC120B12-sensitiven *C. albicans* Wildtyp (SC5314). In der unbehandelten Kontrolle (A1) kann, wie erwartet, hauptsächlich das Endprodukt der Synthese Ergosterol und sehr kleine Mengen an Lanosterol und Eburicol (4,4,14-Trimethylergosta-8,24(28)-Dien-3 $\beta$ -ol) detektiert werden. Es ist keine Inhibition des Synthesewegs erkennbar.

Nach einer Inkubation der Pilzzellen mit Fluconazol (2  $\mu$ g/ml) nimmt die Ergosterolmenge stark ab und stattdessen nehmen die Mengen an Ergosterol-Vorstufen stark zu. Wie in A3 zu sehen handelt es sich dabei um Lanosterol, Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Wie oben bereits beschrieben, ist 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol normalerweise nicht in der Pilzzelle zu finden und wird bei der Inhibition der Lanosterol-Demethylase gebildet. Dieses Sterol kann folglich als Marker für die Inhibition an dieser Stelle der Ergosterol-Biosynthese dienen (Sanglard und Odds, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass Erg11p (Lanosterol-Demethylase) nach der Inkubation mit dem Azol Fluconazol inhibiert wird.

Neben Ergosterol akkumulieren vorwiegend Lanosterol, Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol als Effekt der Inhibition von Erg11p. Lanosterol wird durch einen Nebenweg in das C14-methylierte-Sterol konvertiert. 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ist potentiell toxisch und eine Anreicherung des Sterols in der Zelle kann das Zellwachstum beeinträchtigen (Sanglard und Odds, 2002; Kelly, 1995; Marichal et al., 1995). Nach Inkubation mit höheren Konzentrationen an Fluconazol, sehen die Sterolmuster sehr ähnlich aus und das Endprodukt Ergosterol nimmt, je höher die Konzentration ist, immer mehr ab (Daten nicht gezeigt). Bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml EMC120B12 sind identische Hemmeffekt auf den *C. albicans* Wildtyp wie bei der zuvor verwendeten Konzentration an Fluconazol (2  $\mu$ g/ml) erkennbar und es sind sehr ähnliche Veränderungen im Sterolmuster detektierbar. Nach Inkubation der Zellen mit EMC120B12 ist die Ergosterolmenge ist

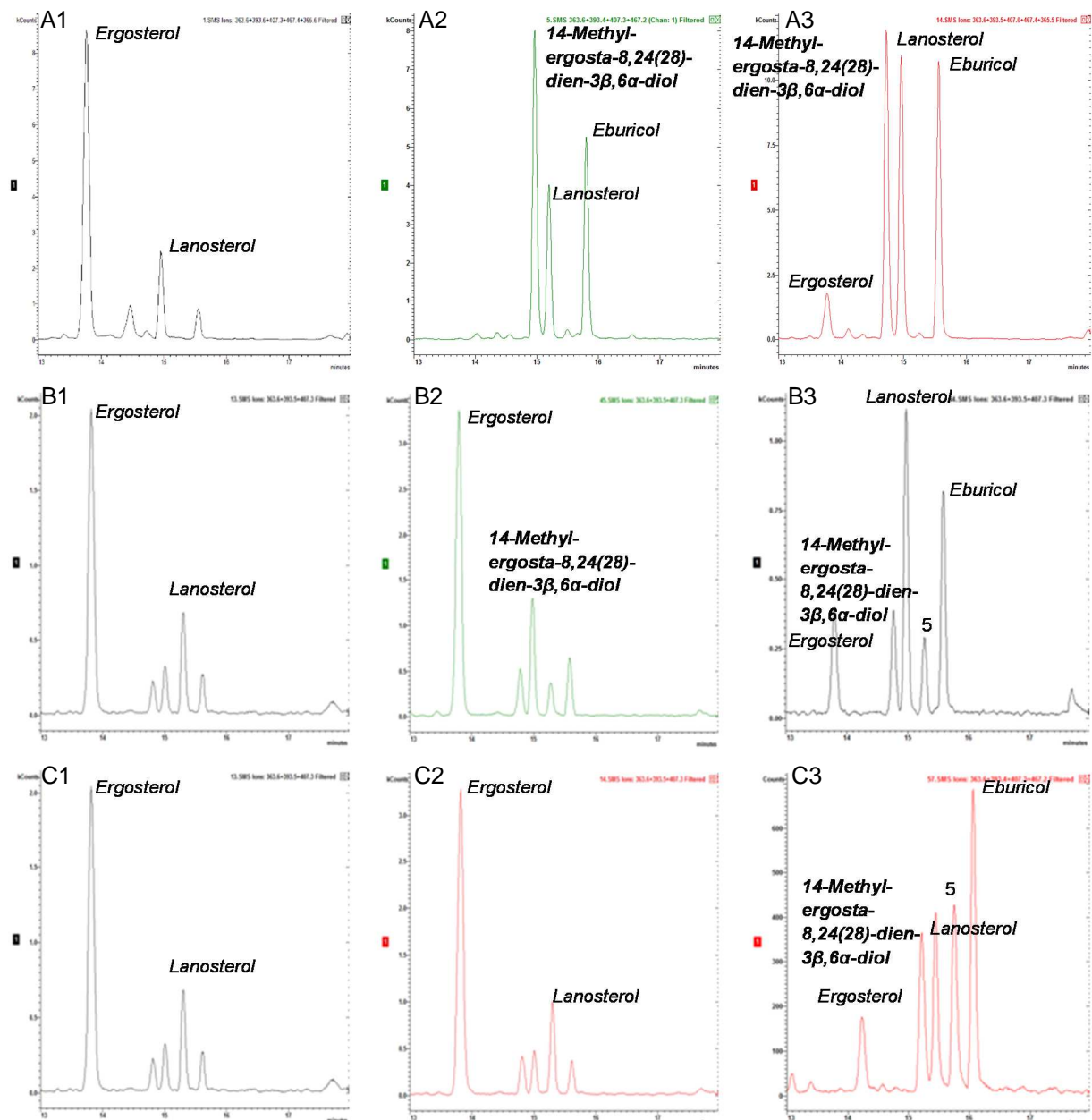
sehr gering und Lanosterol, Eburicol und 14-Methylergosta-8,24-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol akkumulieren (A2). Dies ist derselbe Effekt wie bei Fluconazol, nur ist eine geringe Konzentration an EMC120B12 dafür nötig.

Im Allgemeinen ist mit allen EMC120B12 inkubierten Proben eine geringere Konzentration an Ergosterol detektierbar. Des Weiteren führen aber beide Substanzen zu einer Akkumulation von C14-methylierten-Sterolen, wobei 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol in höheren Konzentrationen bei EMC120B12 akkumuliert.

Beim Azol-resistenten *C. albicans*-Stamm Can741 (B1-B3 und C1-C3) sind viel höhere Konzentrationen der beiden Inhibitoren nötig, um eine Veränderung im Sterolmuster zu initiieren. Behandelt man die Zellen mit 4  $\mu$ g/ml EMC120B12 (B2) führt dies zu keiner Reduktion des Ergosterol-Gehaltes, der Inhibitionsmarker 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ist jedoch in geringen Mengen detektierbar. Die Lanosterol-Konzentration ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (B1) konstant. Das Chromatogramm für 2  $\mu$ g/ml Fluconazol (C2) zeigt keine Unterschiede zu der unbehandelten Kontrolle. Dies bestätigt die zuvor erhaltenen Daten des MHK-Wertes für das Azol-resistente Isolat Can741. Wie zu erwarten, ist bei der Konzentration von 2  $\mu$ g/ml kein Effekt auf den Pilz sichtbar und die Bildung von Ergosterol wird nicht beeinflusst.

Um einen inhibitorischen Effekt und eine Veränderung im Sterolmuster zu erkennen, sind höhere Konzentrationen der Wirkstoffe nötig. C3 zeigt das Sterolmuster von Can741 nach Zugabe von Fluconazol 32  $\mu$ g/ml, B3 die akkumulierenden Sterole nach Behandlung mit EMC120B12 16  $\mu$ g/ml. Im Vergleich zu EMC120B12 nehmen Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol mit Fluconazol mehr zu und Lanosterol nimmt mehr ab. Bei Fluconazol kommt zudem ein weiteres Zwischenprodukt der Synthese, hier Sterol 5 genannt, hoch. Jedem detektierten Sterol wurde eine Nummer zugeordnet. Diese ist in Klammern hinter dem Sterolnamen vermerkt. Bei Sterol 5 handelt es sich um 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Das Massenspektrum dieses Sterols lässt aber zwei weitere Optionen zu. Zum einen 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**7**) und 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**11**). Über die relative Retentionszeit (RRT) von Sterol 5 lässt es sich aber eindeutig als 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol identifizieren (kalkulierte RRT 1,49). Die RRTs sind für die anderen optionalen Sterole kürzer. Für 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol beträgt diese 1,36 und die Retentionszeit für 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ist 1,40.

In B3 (16 µg/ml) ist im Vergleich zu B2 (4 µg/ml) eine Zunahme von Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol messbar. Bei beiden Wirkstoffen ist in diesen hohen Konzentrationen (Fluconazol 32 µg/ml, EMC120B12 16 µg/ml) nun eine Hemmung der Ergosterolproduktion in der Zelle zu sehen. Ergosterol nimmt sehr stark ab, das Endprodukt wird nur noch in kleinen Mengen gebildet. Fluconazol inhibiert eindeutig, wie erwartet, das Enzym Lanosterol-Demethylase (Erg11p). Das Sterolmuster zeigt, für eine Hemmung von Erg11p typisch, eindeutig die Akkumulation des Marker-Sterols 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol und aller weiteren zu erwartenden Zwischenprodukte, sowie eine stark verminderte Menge an Ergosterol. Nach Behandlung mit EMC120B12 ist das Sterolmuster bis auf kleine Verschiebungen in den Verhältnissen der einzelnen Sterole kaum vom Chromatogramm von Fluconazol zu unterscheiden. Hier ist ebenso eindeutig das Marker-Sterol 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol detektierbar, Ergosterol nimmt ab und es sind die gleichen weiteren Sterole zu finden, wie dies für Fluconazol der Fall ist. Dies deutet stark darauf hin, dass EMC120B12 dasselbe Enzym wie Fluconazol die Lanosterol-Demethylase (Erg11p) inhibiert angreift. EMC120B12 verhält sich somit wie ein Azol und hat dasselbe Target in der Zelle. Der einzige sehr interessante Unterschied besteht darin, dass von EMC120B12 nur die Hälfte der Konzentration nötig ist, um einen ähnlich starken Hemmeffekt auf den Pilz zu haben wie dies für das Azol Fluconazol der Fall ist.



**Abbildung 30: Chromatogramme der extrahierten Ionen akkumulierender Sterole nach Behandlung von *C. albicans* Wildtyp Can14 und *C. albicans* Can741 mit Fluconazol und EMC120B12**

**Oben:** Ergebnisse für Can14 von links nach rechts: Unbehandelte Kontrolle (A1), 0,5 µg/ml EMC120B12 (A2), 2 µg/ml Fluconazol (A3)

**Mitte:** Ergebnisse für Can741 von links nach rechts: Unbehandelte Kontrolle (B1), 4 µg/ml EMC120B12 (B2), 16 µg/ml EMC120B12 (B3)

**Unten:** Ergebnisse für Can741 von links nach rechts: Unbehandelte Kontrolle (C1), 2 µg/ml Fluconazol (C2), 32 µg/ml Fluconazol (C3)

### 3.8.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sterolmuster von *C. albicans*

Die Ergebnisse der Sterolanalysen für *C. albicans* legen nahe, dass die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (Erg11p) im Ergosterol-Biosyntheseweg der Wirkort des Benzimidazols EMC120B12 ist, wie dies für Azole bekannt ist. Das ist das erste Mal,

dass dies für ein Benzimidazol-Derivat gezeigt werden konnte. Die Chromatogramme und die Inhibition sind denen in dieser Arbeit für Fluconazol gezeigten Daten sehr ähnlich und die gleichen Sterole akkumulieren bei beiden Wirkstoffen. Die gleiche Übereinstimmung gab es bei weiteren *C. albicans* Stämmen, die in Laufe dieser Arbeit getestet wurden. EMC120B12 interagiert somit wie ein Azol im Ergosterol-Syntheseweg und nicht wie ein Benzimidazol. Wie die Sterolmuster nach Inkubation mit einem Benzimidazol aussehen, konnte ebenfalls gezeigt werden. Nocodazol interferiert im Vergleich zu EMC120B12 nicht mit der Ergosterol-Biosynthese. Wie bereits oben ausgeführt, haben Fluconazol und EMC120B12 denselben Wirkort. Der Vorteil von EMC120B12 gegenüber Fluconazol bei der Inhibition von Erg11p ist jedoch, dass viel weniger Wirkstoff von EMC120B12 nötig wird, um den gleichen Effekt in der Pilzzelle auszulösen.

#### **3.8.3.4 Sterolanalysen von *C. krusei* nach Behandlung mit antimykotischen Wirkstoffen zur Aufklärung des Wirkortes von EMC120B12**

Für *C. krusei* wurden auf dieselbe Art Sterolanalysen nach Fluconazol-Behandlung und nach Behandlung mit EMC120B12 wie zuvor für *C. albicans* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Chromatogrammen A1-A3 und B1-B3 in Abbildung 31 dargestellt. Die Daten wurden miteinander und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Wie nach Ergebnissen dieser Arbeit erwartet, waren für *C. krusei* viel höhere Konzentrationen an Fluconazol nötig, um einen Einfluss auf die Ergosterol-Biosynthese zu beobachten. Interessanterweise konnte schon bei einer niedrigen Konzentration von 0,5 µg/ml EMC120B12 (B1) die Akkumulation des Marker-Sterols 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol und von Eburicol beobachtet werden. Die Ergosterolmenge war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (A1) jedoch nicht reduziert. Dies entspricht den unter 3.4 gezeigten MHK-Daten. Bei der gleichen Konzentration Fluconazol (0,5 µg/ml) ist die Sterolzusammensetzung im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert (A2), die Ergosterol-Synthese ist nicht beeinträchtigt. Bei 32 µg/ml Fluconazol (A3) sind erste relevante Veränderungen im Sterolmuster zu sehen und es sind kleine Mengen anderer Sterole neben Ergosterol detektierbar. Die Synthese des Endproduktes Ergosterol ist aber ebenso nicht beeinträchtigt. Schaut man sich die Ergebnisse nach Behandlung mit 1 µg/ml EMC120B12 (B2) an, ist ein starker Rückgang von Ergosterol zu sehen. Zudem sind die für eine Inhibition der

Lanosterol-Demethylase typischen Sterole 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol und Eburicol, sowie etwas Lanosterol detektierbar.

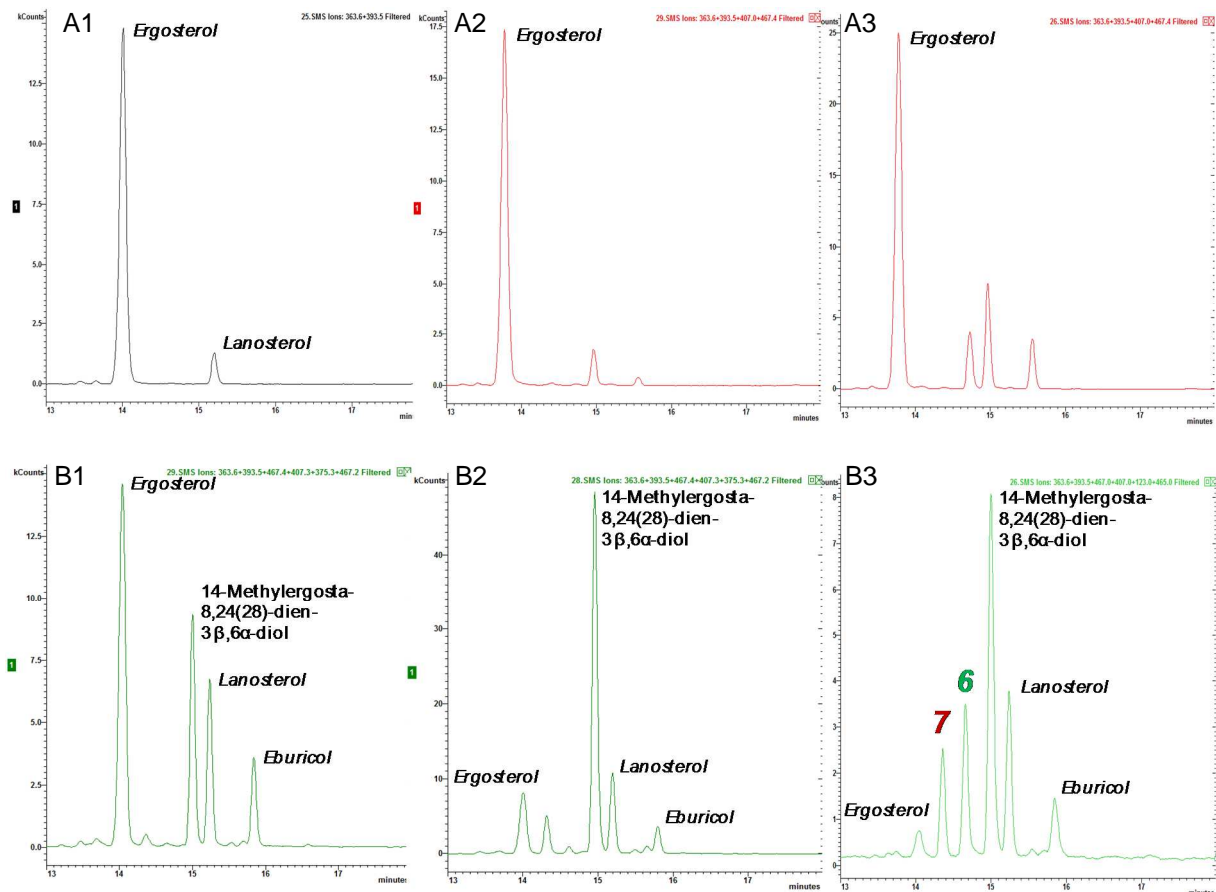
Betrachtet man *C. krusei* nach einer Behandlung mit 16  $\mu\text{g/ml}$  EMC120B12 (B3), entspricht dies dem Sterolmuster von 1  $\mu\text{g/ml}$  EMC120B12 (B2), doch sind in B3 zusätzliche Peaks erkennbar. Dies sind Peaks neuer und bisher unbekannter Sterole, die laut Datenbanken (Datenbank Labor Bracher, NIST<sup>TM</sup>-Datenbank und Daten aus der Literatur, wie unter Müller et al., 2013 beschrieben) keinem bisher bekannten Sterol zugeordnet werden konnten, die bereits ab 4  $\mu\text{g/ml}$  EMC120B12 beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese unter EMC120B12 akkumulierenden Sterole sind bisher nicht in der Literatur beschrieben und wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal detektiert und identifiziert. Beide Sterole besitzen eine 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -Diol-Struktur, wie das Marker-Sterol, und konnten als Derivate von 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol mittels Retentionszeiten und Massenspektren zugeordnet werden. Die Vorgehensweise dieser Identifizierung ist unter 2.14 und 2.15 beschrieben. Sterol 6 ist 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol und bei Sterol 7 handelt es sich um 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Bei genauerem Betrachten der Sterolzusammensetzung unter EMC120B12 können zudem geringe Mengen von Sterol 5, dem 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, gefunden werden. Dieses Sterol ist unter Fluconazol nicht detektiert worden. In Abbildung 32 ist ein Chromatogramm zur Übersicht aller Sterolfractionen des *C. krusei* Wildtyp nach Behandlung mit 4  $\mu\text{g/ml}$  EMC120B12 dargestellt. Hier sind alle messbaren Sterole auch in den geringsten Mengen aufgeführt. Dadurch, dass alle messbaren Sterole nach Inkubation mit EMC120B12 hiermit bekannt sind, lässt sich der Syntheseweg nach Inhibition EMC120B12 weiter verstehen.

Wie schon im Kapitel zu den Sterolanalysen von *C. albicans* erwähnt, erlaubt das Massenspektrum von 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ebenfalls die Option eines der neuen Sterole 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sterol 7) oder das 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sterol 11). Die drei Sterole können nur durch die relative Retentionszeit voneinander abgegrenzt werden. Im Kapitel zuvor ist bereits beschrieben, wie 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sterol 5) eindeutig dem Peak zugeordnet werden konnte. Diese Zuordnung über die relative Retentionszeit (RRT) war für die beiden anderen Sterole ebenfalls erfolgreich. Die RRTs von  $\Delta^{7,22}$  und  $\Delta^{7,24}$ -Sterolen sind signifikant verschieden. Für Sterol 7 liegt die kalkulierte Zeit exakt bei 1,36 und für die einzige Alternative 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol

liegt die RRT bei 1,40. Folglich konnte in dieser Arbeit das neue Sterol 7 eindeutig als 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol identifiziert werden. Die RRT erlaubt eine sehr korrekte Lokalisierung der Doppelbindung im Sterol (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16 verändert nach Keller et al., 2015). Dadurch konnte auch Sterol 6 eindeutig als 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (RRT 1,39) identifiziert werden und die nach Masse ebenfalls mögliche Struktur 14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sterol 9) konnte mit einer RRT von 1,44 als Option ausgeschlossen werden. Auf dieselbe Weise konnte auch Sterol 16 als 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol bestimmt und Sterol 5 als 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol identifiziert werden. Die Massenspektren aller detektierten Sterole sind zur Zusammenfassung in Abbildung 33 dargestellt.

Das neue Sterol 7 konnte somit in dieser Arbeit eindeutig zugeordnet werden. Das Massenspektrum zeigt dieselbe Fragmentierung wie bei Sterol 4 und 5, aber mit einer anderen Mengenverteilung der typischen Fragmente. Der Basispeak ist nicht  $m/z$  467 wie bei Sterol 4 oder  $m/z$  377 wie bei Sterol 5, sondern  $m/z$  253 [M-CH<sub>3</sub>-2TMS-SC]<sup>+</sup>. Dieser Basispeak und ein weiteres Fragment 343 [M-CH<sub>3</sub>-TMS-SC]<sup>+</sup> sind typisch für  $\Delta^{22}$ -Sterole, aber nicht für  $\Delta^{24(28)}$ -Sterole (Nakanishi et al., 1987). Die einzige alternative Struktur für Sterol 7 war 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sterol 11), was durch die Analyse der RRT ausgeschlossen werden konnte.

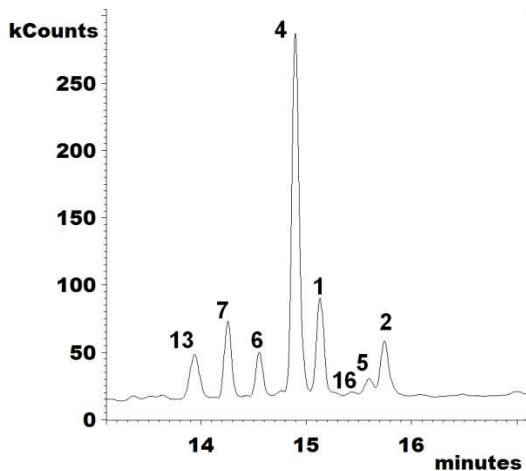
Im Massenspektrum von Sterol 6 mit einem Basispeak von  $m/z$  570 ist eine weitere Doppelbindung im Vergleich zu Sterol 4, 5 oder 7 erkennbar. Daher kommen für das Sterol zwei Strukturen in Frage. Zum einen 14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sterol 9) oder 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Auch hier konnte die RRT eindeutig zeigen, dass es sich bei dem neuen Sterol 6 um 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol handelt.



**Abbildung 31: Chromatogramme der extrahierten Ionen akkumulierender Sterole nach Behandlung von *C. krusei* Wildtyp mit Fluconazol und EMC120B12**

**Oben von links nach rechts:** *C. krusei* WT unbehandelt (A1), Fluconazol 0,5  $\mu$ g/ml (A2), Fluconazol 32  $\mu$ g/ml (A3).

**Unten von links nach rechts:** *C. krusei* WT EMC120B12 0,5  $\mu$ g/ml (B1), EMC120B12 1  $\mu$ g/ml (B2), EMC120B12 16  $\mu$ g/ml (B3).



**Abbildung 32: Chromatogramm aller detektierten Sterolfractionen von *C. krusei* Wildtyp nach Behandlung mit 4  $\mu$ g/ml EMC120B12**

Detektierte Sterole: **1** Lanosterol, **2** Eburicol, **4** 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **5** 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **6** 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **7** 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **13** Ergosterol, **16** 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (Nach Keller et al., 2015).



**Tabelle 15: Übersicht der berechneten und detektierten RRTs der Sterole sortiert nach verschiedenen Grundstrukturen**

Mit einem Stern markierte Sterole wurden in dieser Arbeit nicht identifiziert und wurden anhand der bekannten Literatur und biochemischer Gegebenheiten postuliert. Die RRT erlaubt eine sehr korrekte Lokalisierung der Doppelbindung im Sterol. Jedem detektierten Sterol wurde eine Nummer zugeordnet. Diese ist in Klammern hinter dem Sterolnamen vermerkt und wird auch in weiteren Abbildungen verwendet (Verändert nach Keller et al., 2015).

<b>Sterole mit 3<math>\beta</math>,6<math>\alpha</math>-Diol-Struktur</b>	<b>kalkulierte RRT</b>	<b>detektierte RRT</b>
14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>4</b> )	1.44	1.43
14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>5</b> )	1.47	1.49
14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>6</b> ) 31	1.41	1.39
14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>7</b> ) 30	1.36	1.36
14-Methylergosta-8-en-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>8</b> ) (*)	1.40	(-)
14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>9</b> ) (*)	1.44	(-)
14-Methylergosta-7-en-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>10</b> ) (*)	1.44	(-)
14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ( <b>11</b> ) (*)	1.40	(-)
<b>Sterole mit 4,4,14-Trimethyl-Struktur</b>	<b>kalkulierte RRT</b>	<b>detektierte RRT</b>
4,4,14-Trimethylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (Eburicol) ( <b>2</b> )	1.51	1.51
4,4,14-Trimethylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol ( <b>14</b> ) (*)	1.48	(-)
4,4,14-Trimethylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol ( <b>15</b> ) (*)	1.45	(-)
4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol ( <b>16</b> )	1.49	1.48
4,4,14-Trimethylergosta-8-en-3 $\beta$ -ol ( <b>17</b> ) (*)	1.48	(-)
4,4,14-Trimethylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol ( <b>18</b> ) (*)	1.55	(-)

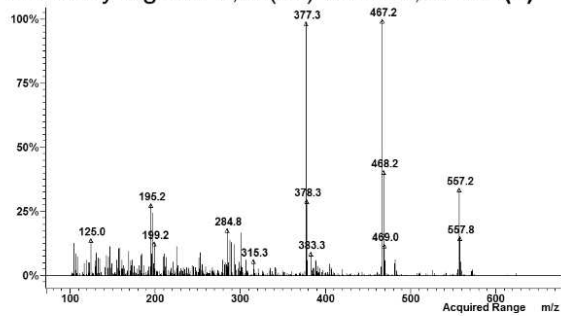
**Tabelle 16: Zusammenhang der relativen Retentionszeit und der Position der Doppelbindung im Sterol**

Die RRT erlaubt eine sehr korrekte Lokalisierung der Doppelbindung im Sterol. Ähnliche Sterole können so unterschieden werden.  $\Delta RRT = RRT \text{ Sterol 1} - RRT \text{ Sterol 2}$ .

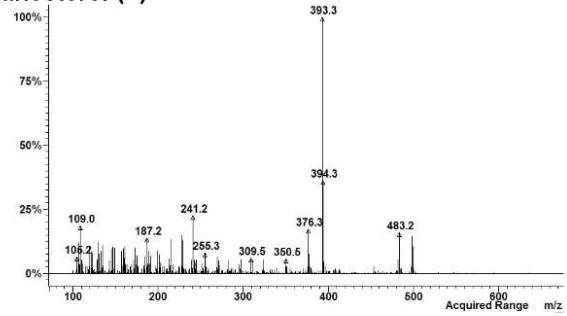
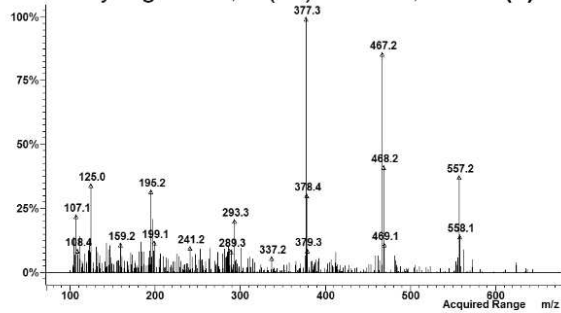
Eine zusätzliche Doppelbindung an C24 resultiert in einer höheren RRT. Eine zusätzliche Doppelbindung an C22 resultiert in einer niedrigeren RRT.

<b>Sterol 1</b>	<b>Sterol 2</b>	<b><math>\Delta RRT</math></b>
Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol	Ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol	+ 0.04
Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol	+ 0.04
Ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol	+ 0.04
Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	- 0.07
Ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	- 0.07
Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-5,7,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	- 0.06
Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	- 0.04
Ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	- 0.04
Ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	+ 0.03
Ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	Ergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	+ 0.03

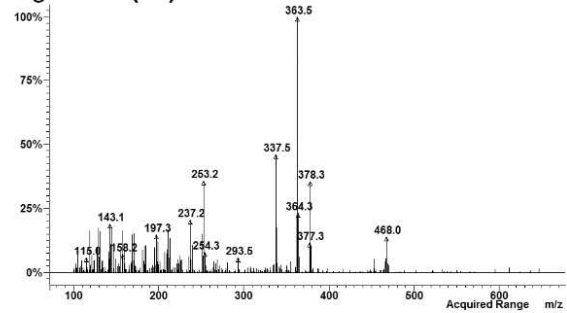
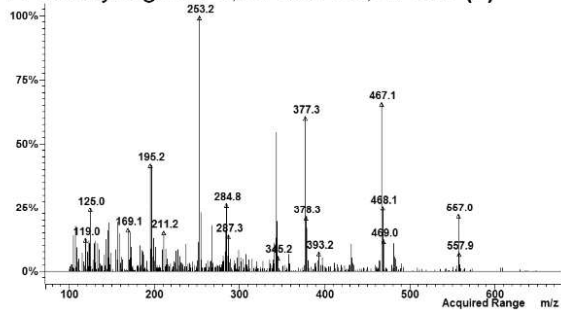
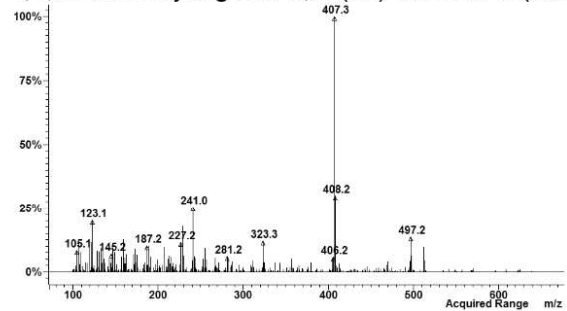
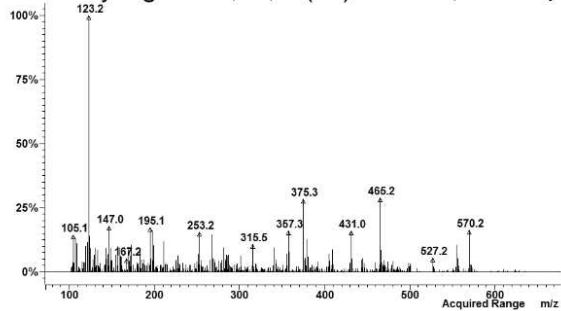
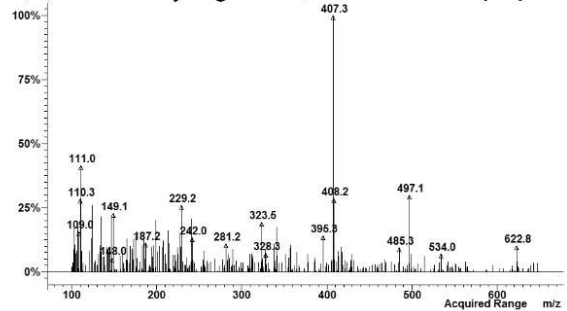
Im weiteren Vorgehen dieser Arbeit sollte zum einen geklärt werden, wo in der Ergosterol-Biosynthese diese neuen Sterole gebildet werden und wo diese einzuordnen sind und zum anderen, ob sich die Bildung dieser Sterole EMC120B12 von der Wirkungsweise von Fluconazol unterscheidet. Hierzu wurden zunächst die neuen Sterole in den Ergosterol-Biosyntheseweg eingeordnet. Der vermutete Syntheseweg und die Einordnung der neuen Sterole in die Ergosterol-Biosynthese ist in Abbildung 34 dargestellt.

14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (4)

lanosterol (1)

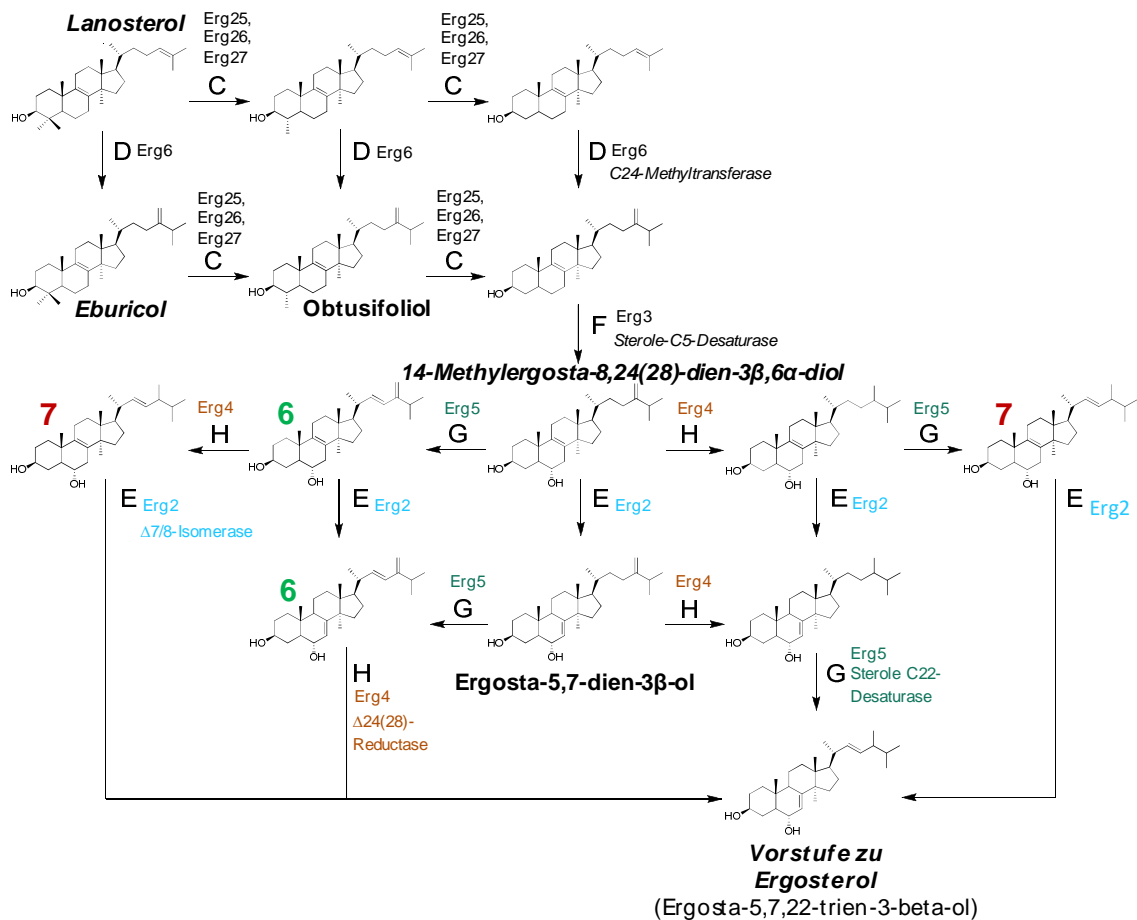
14-methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (5)

ergosterol (13)

14-methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (7)4,4,14-trimethylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (eburicol) (2)14-methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (6)4,4,14-trimethylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (16)

**Abbildung 33: Massenspektren aller detektierten Sterole von *C. krusei* nach Behandlung mit 4  $\mu$ g/ml EMC120B12**

Links: Alle Sterole mit einer 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol-Struktur rechts: Restliche Sterole (Nach Keller et al., 2015).

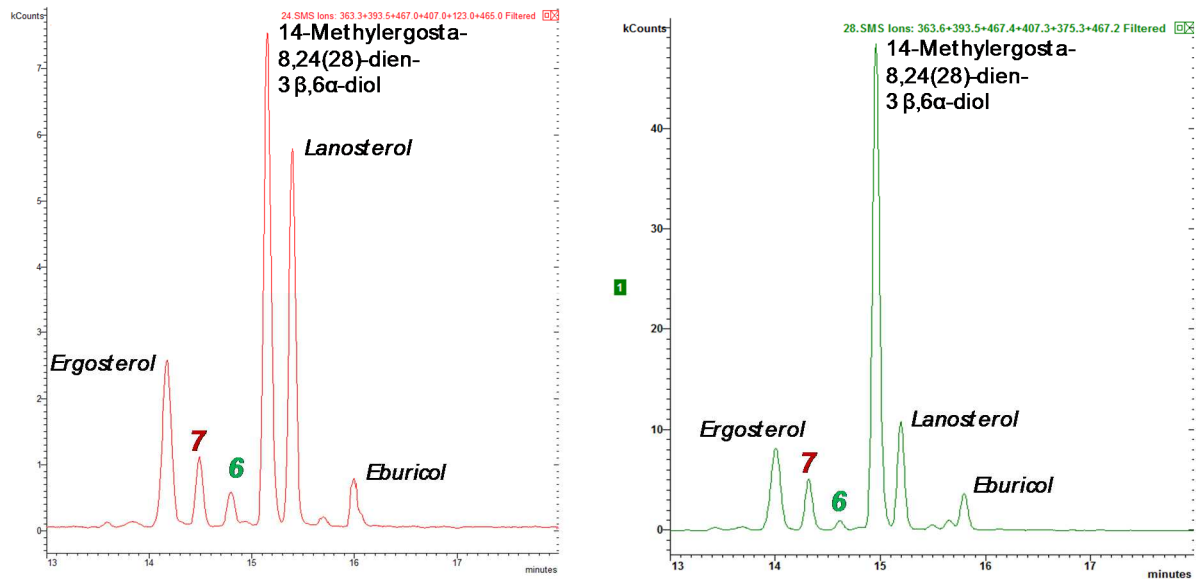


**Abbildung 34: Einordnung der neu identifizierten Sterole in *C. krusei* in den Ergosterol-Biosyntheseweg nach Inkubation mit EMC120B12 > 4µg/ml**

Die neuen Sterole 6 (14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3β,6α-diol) und 7 (14-Methylergosta-8,22-dien-3β,6α-diol) sind beides Derivate des 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol, das typisch für die Erg11p Inhibition ist.

Nach diesen neuen Erkenntnissen wurde *C. krusei* auch mit höheren Konzentrationen an Fluconazol getestet. Diese getesteten Konzentrationen sind klinisch nicht relevant und werden bei Behandlungen nicht eingesetzt. Bei einer Konzentration an Fluconazol von 256 µg/ml zeigt *C. krusei* ein vergleichbares Sterolmuster wie das nach Behandlung mit 1 µg/ml EMC120B12. Es können Ergosterol, die für eine Hemmung der Lanosterol-Demethylase typischen Sterole und die neuen Sterole 6 und 7 identifiziert werden. Die Hauptkomponente des Sterol 6 bei 1 µg/ml und 16 µg/ml EMC120B12 ist die 3β,6α-diol-Struktur. Dieses Sterol ist bei *C. albicans* nicht zu finden. Nach Behandlung mit EMC120B12 wurden beide Sterole bereits identifiziert.

Die Sterole sind aber auch eindeutig detektierbar, wenn *C. krusei* mit sehr hohen Konzentrationen von Fluconazol (256 µg/ml) behandelt wird. In Abbildung 35 sind die Sterolmuster von *C. krusei* nach Behandlung mit 256 µg/ml Fluconazol (links) und 1 µg/ml EMC120B12 (rechts) dargestellt. Hier ist die Ähnlichkeit der Sterolzusammensetzung eindeutig erkennbar. Die beiden neuen Sterole 6 und 7 sind bei beiden Behandlungen detektierbar und der Ergosterolgehalt ist im Vergleich zu einer unbehandelten Probe deutlich reduziert. Trotzdem ist die Inhibition nach 1 µg/ml EMC120B12 stärker als bei 256 µg/ml Fluconazol, der Gehalt an Endprodukt ist bei 1 µg/ml EMC120B12 geringer. Auch 1024 µg/ml Fluconazol wurden im Laufe der Arbeit im Vergleich zu EMC120B12 getestet (Daten nicht gezeigt). Das Sterolmuster nach der Behandlung mit 1024 µg/ml Fluconazol ist mit dem von 16 µg/ml EMC120B12 genauso vergleichbar, wie das von 256 µg/ml Fluconazol mit dem von 1 µg/ml EMC120B12. Das Endprodukt Ergosterol ist in beiden Proben nicht detektierbar, darüber hinaus sind jedoch dieselben Sterole, die in Abbildung 35 dargestellt sind, auch in diesen extrem hohen Konzentrationen zu finden. Diese Ergebnisse zeigen wiederum, dass der Wirkmechanismus von Fluconazol und EMC120B12 sehr ähnlich ist. EMC120B12 inhibiert jedoch effektiver und wirksamer als Fluconazol und so entspricht das Sterolmuster von 256 mg/ml Fluconazol dem von 1 µg/ml EMC120B12. Aus der hohen Effektivität resultiert ein weiterer Vorteil von EMC120B12 gegenüber Fluconazol: Von EMC120B12 ist nur eine geringe, nicht toxische Dosis nötig. Bei Fluconazol werden für eine ähnliche Inhibition des Wachstums von *C. krusei* Mengen benötigt, die in der Klinik nicht eingesetzt werden können. Trotz der sehr hohen Konzentrationen an Fluconazol ist mehr Ergosterol detektierbar als nach Verwendung der nicht toxischen Menge an EMC120B12.



**Abbildung 35: Vergleich der Sterolmuster von *C. krusei* nach Behandlung mit Fluconazol und EMC120B12**

Links: 256 µg/ml Fluconazol, rechts: 1 µg/ml EMC120B12. Die Ähnlichkeit der Sterolzusammensetzung ist eindeutig erkennbar. Die neuen Sterole 6 und 7 sind bei beiden Behandlungen detektierbar und der Ergosterolgehalt ist im Vergleich zu einer unbehandelten Probe deutlich reduziert. Der Gehalt an Endprodukt ist bei 1 µg/ml EMC120B12 jedoch geringer.

### 3.8.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der biochemischen Analyse der Sterolmuster von *C. krusei*

Betrachtet man die Ergebnisse der Sterolanalysen für *C. krusei* ist die Ähnlichkeit der Muster für Fluconazol und EMC120B12 eindeutig erkennbar. Sie unterscheiden sich aber deutlich in der benötigten Konzentration. Dies lässt allerdings wieder darauf schließen, dass beide Substanzen denselben Wirkort und dasselbe Zielenzym in der Zelle haben, Erg11p. EMC120B12 ist daher ein Inhibitor des Enzyms Lanosterol-Demethylase wie die Triazole Fluconazol oder Voriconazol.

Darüber hinaus führten beide hier verwendeten Inhibitoren zu einer Akkumulation von weiteren C14-methylierten Sterolen wie 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β-ol und 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3β-ol, sowie 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3β,6α-diol (Sterol 6) und 14-Methylergosta-8,22-dien-3β,6α-diol (Sterol 7). Das Sterol 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3β-ol (Sterol 16) ist Eburicol (4,4,14-Trimethylergosta-8,24(28)-dien-3β-ol) sehr ähnlich. Die Arbeitsgruppe um Fan (Fan et al., 2013) konnte ebenfalls zwei Ergosterol-Vorstufen mit einer 4,4,14-Trimethyl-Struktur detektieren. Von den Autoren wurden keine MS-Daten zur Verfügung gestellt, doch möglicherweise ist eines dieser Beschriebenen das in dieser Arbeit nachgewiesene Sterol 16.

### 3.8.3.6 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse der GC/MS-Analysen von *C. albicans* und *C. krusei*

In dieser Arbeit wurden alle GC/MS-Analysen der Sterolzusammensetzungen unter denselben Bedingungen durchgeführt. Daher sind die hier bestimmten RRTs im Bezug auf den internen Standard Cholestan (RRT = 1,00) vergleichbar. Die Bestimmung der RRTs bekannter Sterole erlaubt Rückschlüsse auf die Struktur der neuen und unbekanntem Sterole (Datenbank synthetisierter Sterole des Labors von Bracher (LMU München), der NIST™-Datenbank und Daten aus der Literatur, wie unter Müller et al., 2013 beschrieben). Die hier gefundenen Sterole unterscheiden sich nur in der Anzahl der Doppelbindungen oder in deren Position. Die nach dieser Methode bestimmten Doppelbindungen der detektierten Sterole stimmen mit der Literatur überein und sind ebenfalls in Keller et al., 2015 zu finden. Auf Basis der RRT der bekannten Marker-Sterols und von Eburicol kann die RRT aller anderen hier detektierten Sterole mit der hier angewandten  $\Delta$ RRT-Regeln errechnet werden. Die RRT der Sterole 2 und 4 wurden nicht nur detektiert, sondern zudem auch kalkuliert, um die Verlässlichkeit des hier verwendeten Ansatzes zu überprüfen. Die Unterschiede zwischen der errechneten und der detektierten RRT war in allen Fällen sehr gering. Durch diese Absicherung konnten die neuen Sterole zweifellos durch das Massenspektrum und die RRT identifiziert werden. Das in dieser Arbeit verwendete und für verschiedene *Candida* spp. optimierte System zur Sterolanalyse eignet sich somit sehr gut zur Identifizierung der molekularen Targets von Sterolbiosynthese-Inhibitoren und ist somit ein wertvolles Werkzeug zur Charakterisierung neuer Wirkstoffe gegen humanpathogene Pilze.

Zusammenfassend zeigen diejenigen *Candida*-Stämme, die als sensitiv gegenüber einem der beiden oder beiden Wirkstoffen gelten, mit zunehmender Konzentration eine stetige Abnahme des Ergosterols und parallel dazu einen Anstieg in der Akkumulation von Lanosterol, Eburicol und dem Marker-Sterol 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Resistente Isolate hingegen bilden Ergosterol weiterhin, trotz Zugabe der antimykotischen Substanzen. Je nach Ausprägung der Resistenz akkumulieren bei hohen Konzentrationen auch die drei typischen Sterole der Erg11p-Inhibition und Ergosterol nimmt ab. Das Mengenverhältnis dieser Sterole zueinander unterscheidet sich jedoch teils stark zwischen den verschiedenen Proben. Es ist außerdem häufig die Akkumulation ähnlicher Sterole zu beobachten, die sich lediglich durch minimale Strukturveränderungen von den natürlichen Sterolen unterscheiden, z.B. die

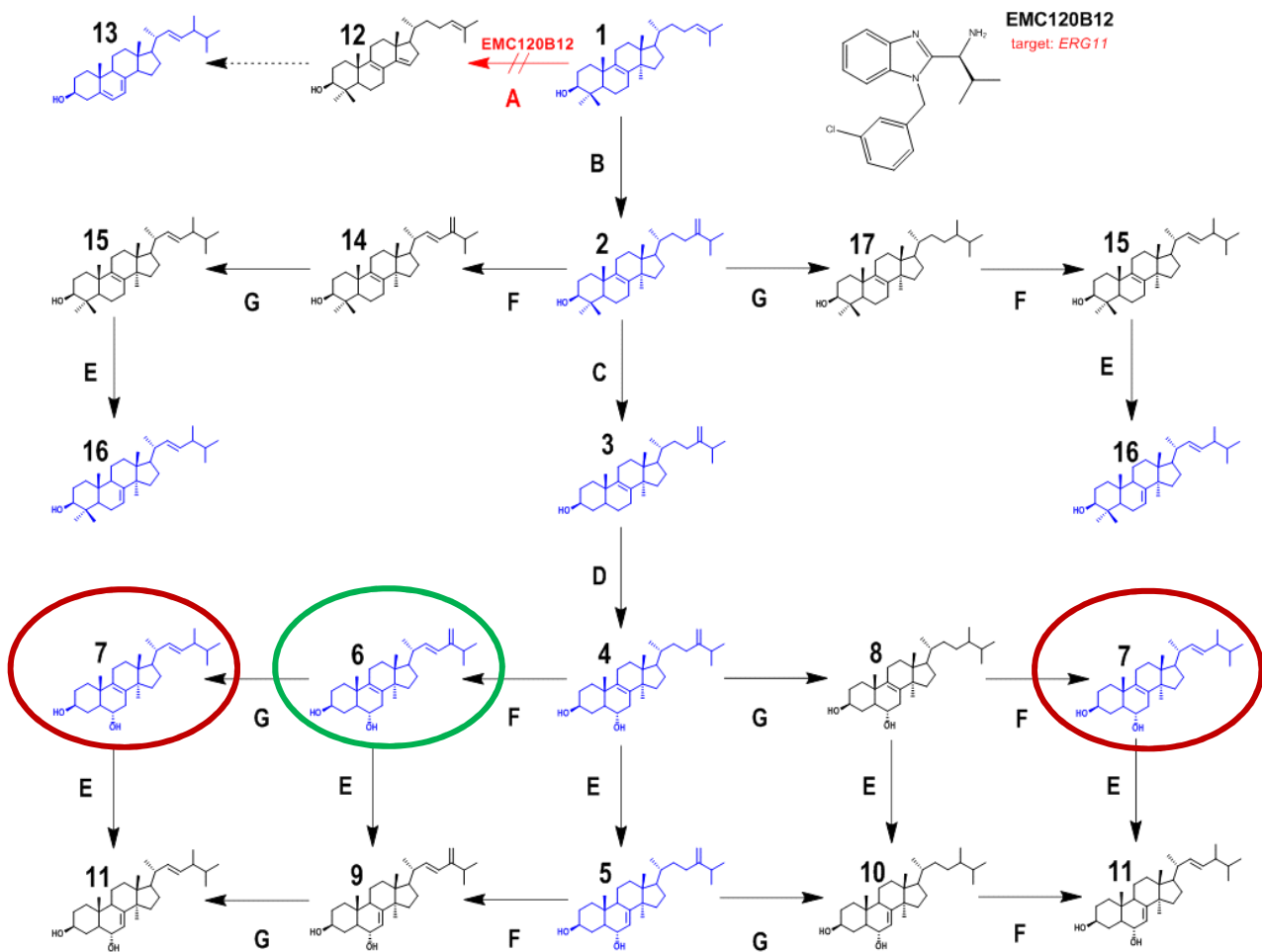
Verschiebung einer Doppelbindung wie bei 4,4,14-Trimethylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol im Vergleich zu Eburicol. Die getesteten *Candida* spp. zeigen also in Abhängigkeit von ihren unterschiedlichen Resistenzcharakteristika und Mutationen auch sehr differente Sterolmuster, wobei die wachstumshemmende Wirkung der beiden Substanzen Fluconazol und EMC120B12 eindeutig erkennbar ist und sich die aus der Behandlung resultierenden Sterolmuster innerhalb einzelner Stämme sehr ähneln.

Nach einer Behandlung mit EMC120B12 akkumuliert das Marker-Sterol der Erg11p-Inhibition und ist eindeutig detektierbar. Neben diesem 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol wurden jedoch weitere bisher unbekannte, neue Derivate dieses Sterols, die alle eine 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol-Struktur aufweisen, in der Pilzzelle identifiziert.

Zudem konnte in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt werden, dass eine Benzimidazol-Struktur in den Ergosterol-Biosyntheseweg eingreift und dort ein Enzym inhibiert. Der Wirkort von EMC120B12 konnte identifiziert werden und ist wie bei Triazolen Erg11p. Der hier gezeigte Unterschied zu Fluconazol liegt in der weitaus höheren Effektivität von EMC120B12. Für einen gleichen Effekt, ist von dieser Substanz viel weniger nötig als von Fluconazol.

Durch die GC/MS-Analysen in dieser Arbeit ist es nun möglich den Ergosterol-Biosyntheseweg nach Behandlung mit EMC120B12 aufzuzeigen. Der Syntheseweg, mit dem Wirkort und allen entstehenden Zwischenprodukten, sowie die Einordnung neu identifizierten Sterole in die Ergosterol-Biosynthese sind in Abbildung 36 dargestellt. Eine Übersicht unbearbeiteter Chromatogramme der ausgewählten Stämme ist im Anhang zu finden.





**Abbildung 36: Erweiterte Ergosterol-Biosynthese unter Inhibition des Enzyms Erg11p**

**Enzyme:** **A** Sterol C14-Demethylase (*ERG11*), **B** Sterol C24-Methyltransferase (*ERG6*), **C** Sterol C4-Demethylase (*ERG25*, *ERG26*, *ERG27*), **D** Sterol C5-Desaturase (*ERG3*), **E** Sterol  $\Delta^{8(7)}$ -Isomerase (*ERG2*), **F** Sterol C22-Desaturase (*ERG5*), **G**  $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase (*ERG4*).

**Sterole:** **1** Lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol (Lanosterol), **2** 4,4,14-Trimethylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (Eburicol), **3** 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (14-Methylfecosterol), **4** 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **5** 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol,

**6** 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **7** 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol,

**8** 14-Methylergosta-8-en-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **9** 14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **10** 14-Methylergosta-7-en-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **11** 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, **12** 4,4-Dimethylergosta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (FF-MAS), **13** Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol (Ergosterol), **14** 4,4,14-Trimethylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol, **15** 4,4,14-Trimethylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol, **16** 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, **17** 4,4,14-Trimethylergosta-8-en-3 $\beta$ -ol.

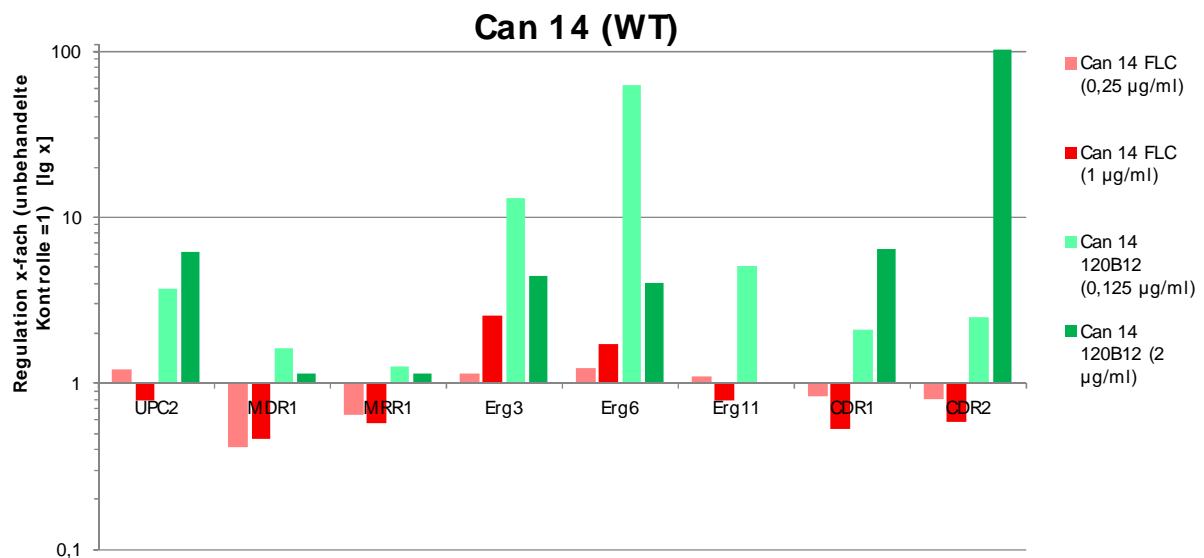
Blau: Detektierte Sterole, Schwarz: Postulierte Sterole, die nicht in dieser Arbeit detektiert wurden, Rot: Inhibition der Enzymreaktion (Verändert nach Keller et al., 2015).

### 3.9 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Mittels qRT-PCR sollte der Einfluss von EMC120B12 auf die Ergosterol-Biosynthese im Vergleich zu Fluconazol auf Genexpressionslevel untersucht werden, um weitere Rückschlüsse auf die Resistenzmechanismen zu ziehen. Dafür wurden solche Gene ausgewählt, die an bekannten Resistenzmechanismen beteiligt sind. Dies umfasst Gene, die für Enzyme der Ergosterol-Biosynthese codieren (*ERG3*, *ERG6*, *ERG11*)

und Gene, die die Expression der Efflux-Pumpen regulieren (*MDR1*, *CDR1*, *CDR2*). Außerdem wurden die dafür zuständigen Transkriptionsfaktoren *UPC2* und *MRR1* in die Untersuchung mit einbezogen. Zur Analyse wurde die qRT-PCR für diese Gene adaptiert und die PCR-Effizienz für die ausgewählten Gene vorab getestet. Die Normalisierung erfolgte durch das Spiken mit MS2-RNA und die Evaluierung der Ergebnisse erfolgte durch relative Quantifikation ( $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode). Als Test-Organismus wurde der *C. albicans* Wildtyp Can14 verwendet und mit ausgewählten Konzentrationen an Fluconazol und EMC120B12 behandelt. Anhand der Resistenzmechanismen soll ein Zusammenhang zu den unterschiedlichen Sterolmustern und somit zur möglichen Wirkweise der Substanz EMC120B12 hergestellt werden. Die mit Hilfe der Light Cycler Software ausgewerteten Daten für Can14 sind in Abbildung 37 dargestellt. Zu sehen ist das x-Fache der in der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Stamms enthaltenen Menge an cDNA für ein bestimmtes Gen. Die Kontrolle entspricht also 1. Auf der y-Achse ist die verstärkte bzw. verminderte Expression eines Gens. Die y-Achse ist zur besseren Darstellung logarithmisch aufgetragen ( $\lg x$ ). Die Standardabweichung der technischen Replikate wurde bereits automatisch über die Software mit einberechnet. Die Abweichungen lagen im Bereich von maximal +/- 5 % der aufgeführten Werte. Die Rohdaten zu diesem Versuch sind im Anhang aufgeführt. Biologische Replikate konnten in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Die Daten der *C. albicans* Wildtyp-Proben zeigen deutliche Unterschiede in den Genexpressionsprofilen abhängig von dem jeweiligen Wirkstoff und dessen Konzentration. Die Behandlung mit Fluconazol zeigt eine Hochregulierung des *ERG3*- und *ERG6*-Gens, die Expression aller anderen untersuchten Gene ist geringer als in der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit EMC120B12 hingegen zeigt ein anderes Ergebnis. Hier ist bei 0,125  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) eine starke Hochregulierung aller *ERG*-Gene und des entsprechenden Transkriptionsfaktors *UPC2* zu beobachten. Vor allem *ERG6* wird um das 60-fache hochreguliert. Die mit 2  $\mu\text{g/ml}$  behandelte Probe zeigt jedoch eine Hochregulierung der Genexpression von *CDR1* und *CDR2*. Für *CDR2* ist diese sogar bis zu 100-fach. Aus diesen Ergebnissen der Untersuchung des *C. albicans* Wildtyp auf Genexpressionsebene lässt sich zwar eine Tendenz ablesen, die Daten sind aber nicht eindeutig. Um genauere Aussagen zu treffen, müssen weitere Replikate und Stämme untersucht werden. Die erste Tendenz weist aber darauf hin, dass es verschiedene Genexpressionsprofile für Fluconazol und EMC120B12 gibt und offensichtlich bei

beiden verschiedene Mechanismen die Erg11p-Inhibition reduzieren. Trotz der gleichen Wachstums-Inhibition durch beide Substanzen, sind die Genexpressionen sehr verschieden. Es gibt eine starke Veränderung im Expressionsprofil nach Behandlung mit EMC120B12. In den niedrigen Konzentrationen von EMC120B12 werden *ERG*-Gene hochreguliert, in hohen Konzentrationen sind es die Effluxpumpen, die hochreguliert werden.



**Abbildung 37: Auswertung der Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR**

Verwendete Daten nach Messung am Light-Cycler. Proben: *C. albicans* Wildtyp (Can14), behandelt mit verschiedenen Konzentrationen an Fluconazol und EMC120B12.

Diese Untersuchung wurde auch für weitere Stämme durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man abschließend die Ergebnisse der qRT-PCRs in ihrer Gesamtheit, ist bei allen getesteten Stämmen ein Unterschied in ihren Genexpressionsprofilen zu sehen. Am deutlichsten wird das beim hier gezeigten *C. albicans* Wildtyp (Can14) sichtbar: Die unterschiedlichen Wirkstoff-Behandlungen führen nicht nur zu teils entgegengesetzten Genexpressionsprofilen, sondern auch die verschiedenen Konzentration an EMC120B12 resultieren in einer sehr differenzierten Hochregulierung der getesteten Gene. Um wirklich Aussagen über die Unterschiede der Genexpression zu treffen, müssen weitere biologische und technische Replikate getestet und zudem andere Stämme genauer untersucht werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 AS-HTS-Screening-Assay

Die Identifizierung und Charakterisierung neuer antimykotisch wirksamer Substanzen gegen humanpathogene Pilze ist schwierig und mit den gängigen Standard-Screenings aufwendig. Mit Hilfe der bislang bekannten Standardmethoden, wie dem EUCAST-Verfahren, kann die antimykotische Wirkung zwar ermittelt, wirksame Verbindungen können jedoch erst in weiteren Tests auf Toxizität geprüft werden (Arendrup et al., 2012; EUCAST, 2008). Der in dieser Arbeit verwendete AS-HTS-Assay vermag als erster Assay die antimykotische Aktivität gegen *C. albicans* und die Verträglichkeit der Wirkstoffe auf Wirtszellen und deren Toxizität in einem Schritt zu beurteilen. Dies ist durch die gleichzeitige Inkubation der zu testenden Substanz mit Humanzellen und dem Pathogen möglich. Durch diesen Aufbau minimiert der AS-HTS-Assay im Vergleich zu den gängigen Tests zusätzlichen Aufwand und Zeit. Der entscheidendste Vorteil dieses neuartigen Assays ist, dass durch diese gleichzeitige Inkubation von Wirt und Pathogen eine wirtsähnliche Umgebung und damit eine natürliche Infektion imitiert wird. Dies hat zur Folge, dass im Screening auch Gene reguliert werden, die nur in der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen aktiviert sind. Durch die Reaktion der Wirtszellen auf das Pathogen und umgekehrt ist das Screening viel näher an einer realen Infektion als jede Standardmethode. Die Gene, welche für die Wirt-Pathogen-Interaktion relevant sind, werden in diesen Standardassays nicht exprimiert und deshalb kann eine andere Reaktion auf Testsubstanzen erfolgen. Dies macht den AS-HTS-Assay einmalig unter allen bekannten Wirkstoff-Screenings. Ein weiterer Vorteil des AS-HTS-Assays ist die angeschlossene Auswertungsmethode. Der Zusatz und die Inkubation mit FDA, welches von den Zellen *in vivo* metabolisiert wird, wird verwendet, um die metabolische Aktivität der Wirtszellen direkt zu bestimmen. Dadurch war auch bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Tests direkt zu sehen, wie die Wirtszellen auf die getestete Substanz reagieren, aber auch, ob die Pilzzellen durch die Substanz im Wachstum wird. Ein Wachstum der Pilzzellen hat ein Sterben der Wirtszellen zur Folge (siehe 3.1.1). Um die Daten aus dem AS-HTS-Assay und die gewonnenen Werte zur inhibitorischen Konzentration mit konventionellen MHK-Bestimmungen zu vergleichen, wurde die MHKs ebenfalls mit der EUCAST-Methode bestimmt (Arendrup et al., 2012; EUCAST, 2008). Die erhaltenen Ergebnisse waren alle mit den Daten des AS-HTS-

Assays vergleichbar. Dies konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (Burger-Kentischer, 2011). Ziel dieser Arbeit war es diesen für *C. albicans* etablierte AS-HTS-Assay an weitere humanpathogene Pilze zu adaptieren. Die angestrebte Adaption an hyphenbildende *Candida*-Stämme war erfolgreich und die Zellzahlen für einen optimalen Assay-Ablauf konnten für diese *Candida*-Stämme bestimmt werden (Abbildung 12). Die Ergebnisse konnten mit Hilfe des EUCAST-Tests wiederum validiert werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen. Bei der Adaption wurde aber eine Limitierung des AS-HTS-Assay festgestellt. *Candida*-Stämme, die keine Hyphen bilden, wie zum Beispiel *C. glabrata*, konnten nicht an den Assay adaptiert werden (3.3.2). Dennoch wurde erreicht, das komplexe Assay-System an *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* zu adaptieren und damit auch die IC<sub>50</sub>-Werte für EMC120B12 zu bestimmen (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Neben der Möglichkeit mit dem Assay eine Substanzbibliothek auf potentielle Wirkstoffe zu screenen, wurde der AS-HTS-Assay in dieser Arbeit auch zur Titration einer Dosis-Wirkungskurve der aus dem Screening hervorgegangenen Hits eingesetzt. Dies diente zum einen, um zwischen fungistatischen oder fungiziden Effekten beim Pathogen zu differenzieren und zum anderen, um zwischen Wachstumsinhibition und Toxizität bei den Wirtszellen zu unterscheiden. Aufgrund der Möglichkeit den AS-HTS-Assay auch zur Titration der Substanzen einzusetzen, bekam der Assay bei seiner Entwicklung den Namenszusatz activity-selectivity (AS) Assay (Kleymann und Werling, 2004).

Insgesamt konnte mit diesem speziellen Assay eine Substanzbibliothek mit mehr als 100.000 diversen heterozyklischen Verbindungen gescreent werden. Davon wurden 3760 der Substanzen in der vorgelegten Arbeit untersucht (Burger-Kentischer et al., 2011). Unter allen Substanzen konnten nur wenige auffällige Verbindungen mit antimykotischer Aktivität gefunden werden. Auch die Verbindungen, die sich als zytotoxisch erwiesen wurden weiter untersucht, um mögliche „lead“-Strukturen zu erkennen. Daher wurden Substanzen, die in jeglicher Hinsicht im Screening auffällig waren, in einem Rescreening titriert und weiter beurteilt (3.1.2).

## **4.2 Die neue antimykotische Substanz EMC120B12**

Die mit dem AS-HTS-Assay identifizierte Substanz EMC120B12, ein (S)-2-Aminoalkylbenzimidazol, erwies sich aufgrund ihrer stark antimykotischen Wirkung und der gleichzeitig guten Verträglichkeit auf Humanzellen als vielversprechender

potentieller Wirkstoff (3.2). Es wurden im Laufe der Arbeit mehrere Syntheseansätze der Substanz mit gleichbleibendem Erfolg getestet. EMC120B12 scheint deshalb ein guter Kandidat für eine Weiterentwicklung zu einem neuen Wirkstoff zu sein. Das (S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazol ist einzigartig und seine chiralen Alkylamin-Reste an zwei Positionen des Benzimidazol-Rings scheinen für die Aktivität der Substanz entscheidend zu sein. Es ist bereits bekannt, dass nur das (S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazol und nicht das (R)-Enantiomer der Verbindung eine antimykotische Aktivität im AS-HTS-Assay zeigt (Bauer et al., 2011; Burger-Kentischer et al., 2011).

Für die Suche nach der „lead“-Struktur wurde eine Reihe von Analoga zu EMC120B12 von EMC microcollections hergestellt. Alle weiteren interessanten Verbindungen, die im Rescreening gute Ergebnisse zeigten, waren Analoga der Substanzgruppe (S)-2-Aminoalkylbenzimidazol. EMC120B12 zeigte von allen getesteten Analoga jedoch die besten Ergebnisse (3.1.3 und Abbildung 10). Es konnten über diese Benzimidazole hinaus auch ein paar wenige weitere interessante Verbindungen gefunden werden, diese konnten jedoch im Rescreening nicht reproduziert werden oder waren in auch in geringeren Konzentrationen zytotoxisch (3.1.2).

Die geringe Hit-Rate in dieser Arbeit zeigt einmal mehr ein, wie schwierig es ist, neue antimykotische Substanzen mit guter Verträglichkeit für die Wirtszellen zu finden und diese zu Antimykotika zu entwickeln. Bedingt dadurch, dass Pilze, wie ihre Wirte, zu den Eukaryoten zählen, gibt es nur wenige mögliche Angriffspunkte für eine Substanz in der Pilzzelle, welche nicht auch in der Wirtszelle zu finden sind. Die Medikamentenentwicklung aus neuen Wirkstoffen ist zudem teuer und die Substanzen haben oft starke Nebenwirkungen. Langzeit-Behandlungen, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, fördert zudem die Entstehung von immer mehr Resistenzen gegen die gängigen Wirkstoffe. Ein weiteres großes Problem stellen Pilze mit einer intrinsischen Resistenz gegen bestimmte Wirkstoffe, wie *C. krusei*, dar. Diese Resistenzen rücken immer weiter in den Vordergrund (Fisher et al., 1989; de Pauw und Meunier, 1999; Pfaller und Diekema, 2007; Odds, 2010; Sanglard und Odds, 2002; Morschhäuser, 2003; Samaranayake und Samaranayake, 1994). Daher es ist wichtig, neue hochwirksame Wirkstoffe zu finden, welche in Zukunft auch zur Behandlung von Pilzinfektionen resistenter Stämme zur Verfügung stehen. Die Entwicklung neuer Substanzen ist daher unabdingbar. Das im Screening auffällige EMC120B12 scheint ein guter Kandidat für eine eventuelle

Weiterentwicklung zu einem Wirkstoff zu sein. Aus diesem Grund wurde sein Wirkmechanismus in dieser Arbeit weiter charakterisiert.

### **4.3 Charakterisierung der neuen antimykotischen Substanz EMC120B12**

#### **4.3.1 Transkriptionsanalysen von *C. albicans***

Erste Transkriptomanalysen von *C. albicans*, welche zuvor mit dem Benzimidazol EMC120B12 behandelt wurden, zeigten, dass EMC120B12, wie für Azole typisch, in die Ergosterol-Biosynthese eingreift (Burger-Kentischer et al., 2011). Ziel dieser Arbeit war es diesen Wirkort zu bestätigen und zudem den genauen Wirkungsmechanismus und das Zielenzym in der Ergosterol-Biosynthese über verschiedene Methoden zu identifizieren und charakterisieren. Dies stellt eine wichtige Grundlage für die Weiterentwicklung dieses potentiellen Wirkstoffs dar.

Dazu wurden zunächst mittels DNA-Microarrays weitere Transkriptdaten von *C. albicans* mit einem neuen und unter 3.2 validierten Batch EMC120B12 ( $IC_{50}=0,4\mu M$ ) durchgeführt. Das Transkriptom des behandelten Pilzes zeigte, dass 38 Gene nach der Zugabe von EMC120B12 hochreguliert waren. 15 dieser Gene konnten der Ergosterol-Biosynthese zugeordnet werden. Zudem waren Gene signifikant reguliert, welche Einfluss auf die Zellwand und die Zellmembran haben und ebenso Gene, die nach Antimykotika-Gabe eine Veränderung in ihrer Regulation erfahren. Der Wirkort konnte mit den Daten eindeutig bestätigt werden. Sie zeigen, dass das Benzimidazol EMC120B12 ein potentieller Inhibitor des Ergosterol-Biosynthesewegs ist. Zudem wurde durch die Versuche mit dem neuen Batch bestätigt, dass die Qualität bei Nachproduktion des Wirkstoffes gleichbleibend konstant gut ist. Dies ist ebenso eine wichtige Voraussetzung für neue Antimykotika.

Von anderen Benzimidazolen ist bekannt, dass sie eine antimykotische Aktivität besitzen. Im Pflanzenschutz werden diese weit verbreitet als Antimykotika eingesetzt, in der Medizin werden sie jedoch nicht zur Behandlung von Pilzinfektionen, sondern als Anthelminthika verwendet. Zudem ist von einigen, wie beispielsweise Nocodazol, eine antineoplastische Aktivität bekannt (Elnima et al., 1981; Sharma et al., 2009). Dies zeigt das zytotoxische Potential dieser Benzimidazole. Von der Substanzklasse der Benzimidazole ist zudem bekannt, dass sie die Bildung des Zytoskeletts und die Zellteilung stören, indem sie an die Mikrotubuli in den Zellen binden. Bisher wurde



nicht beschrieben, dass sie einen Einfluss auf die Ergosterol-Biosynthese haben (Davidse, 1986; Guthrie und Wickner; 1988; Jacobs et al., 1988; Hollomon, 1998). Cholesterol, das unter anderem in Humanzellen gebildet wird, ist dem Ergosterol der Pilze sehr ähnlich, doch laufen die Synthesewege nur bis zum einem gewissen Punkt gleich ab. Ergosterol wird in Pilzen ausgehend von Acetyl-Coenzym A biosynthetisiert. Über verschiedene Zwischenschritte entsteht Lanosterol, das erste Sterol im Biosyntheseweg. Dieses Sterol ist gleichzeitig die letzte gemeinsame Vorstufe von Cholesterol in Säugern und von Ergosterol in Pilzen (Bracher, 2003). Dies ist ein Grund, weshalb Ergosterol und seine Synthese ein geeigneter Angriffspunkt für Antimykotika darstellt. Der Ergosterol-Syntheseweg ist für die Bildung dieser Komponente der Plasmamembran des Pilzes verantwortlich. Hier interagieren auch die Azole, welche die am weitesten verbreitete Antimykotika-Gruppe in der Humantherapie darstellen. Azole haben eine geringe Zytotoxizität und eine hohe Aktivität gegen humanpathogene Hefen. Es ist bekannt, dass die antimykotische Wirkung der Azole auf einer Inhibition der Sterol-C14-Demethylase und somit auf einer Hemmung der Ergosterol-Biosynthese beruht. Das Endprodukt Ergosterol, ein essentieller Bestandteil der Zellmembran, wird nicht mehr gebildet (Akins, 2005; Bracher, 2003).

Zum Vergleich der Wirkungsweise von EMC120B12 mit Benzimidazolen und Azolen wurden Transkriptionsanalysen von *C. albicans* mit dem Azol Fluconazol und dem Benzimidazol Nocodazol durchgeführt. Die unter 3.6 aufgeführten und in Tabelle 14 zusammengefassten Daten zeigen, dass nach einer Fluconazol-Behandlung Gene der Ergosterol-Biosynthese in *C. albicans* differenziell exprimiert werden. Die gefundenen Gene waren in großer Zahl deckungsgleich mit denen aus den Transkriptdaten von EMC120B12. Durch diese Versuche konnte das erste Mal im direkten Vergleich bestätigt werden, dass Fluconazol und EMC120B12 im gleichen Biosyntheseweg, der Ergosterol-Synthese, interagieren. Zudem konnten bei EMC120B12 behandelten Zellen neben der Wirkung auf die Zellmembran eine Wirkung auf die Zellwand und noch wenige weitere Gene gezeigt werden. Dies ist sehr ähnlich zu dem, was auch außerhalb dieser Arbeit für Fluconazol von Angiolella et al. gefunden wurde. Hier zeigte die Analyse der Zellwandprotein-Zusammensetzung, dass eine Behandlung mit Fluconazol zur erhöhten Expression zweier Glucanasen, sowie zu einer erhöhten Menge an hoch glykosyliertem Material im Bezug auf Zellwand-Proteine führt (Angiolella et al., 2002). Diese Modifizierung und Neuordnung der Zellwandstruktur

konnte auch bei anderen antimykotischen Substanzen beschrieben werden. Das weist darauf hin, dass der Effekt nicht als eine spezifische Reaktion auf die Substanzen, sondern als allgemeine metabolische Veränderung in der Pilzzelle angesehen werden könnte. Die Zellen könnten dabei auf die Antimykotika als Stress-Substanzen reagieren, welche so diese allgemeinen Veränderungen verursachen (Rupp, 2008). Der mit den Transkriptdaten eindeutig festgestellte Effekt von EMC120B12 auf die Zellwand könnte daher ebenso indirekt sein.

Mit den Transkriptom-Daten von *C. albicans* nach einer Behandlung mit Nocodazol konnte der in der Literatur beschriebene Einfluss auf die Mikrotubuli und damit weiterführend auf die Zellteilung bestätigt werden (Kunkel, 1980). Zugleich konnte in den Proben kein signifikanter Unterschied für Gene festgestellt werden, welche in Verbindung mit dem Ergosterol-Biosyntheseweg stehen oder Transkriptionsfaktoren für den Syntheseweg darstellen (3.6.5 und Tabelle 14).

Die Betrachtung der Transkriptdaten der verschiedenen Substanzen im Vergleich, brachte die Charakterisierung von EMC120B12 weiter voran. Es wurde dadurch bestätigt, dass EMC120B12 ein Inhibitor der Ergosterol-Synthese ist. Auf Transkriptebeine konnte kein Hinweis auf eine Interaktion mit Mikotubuli gefunden werden. EMC120B12 verhält sich im Bezug auf den Wirkort nicht, wie dies in der Literatur für Benzimidazole beschrieben ist und zu erwarten wäre. Vergleicht man nun die Daten der Transkriptionsprofile von *C. albicans* nach einer Behandlung mit Fluconazol, Nocodazol und EMC120B12, ist eindeutig zu erkennen, dass sich die Transkriptome von EMC120B12 und dem Azol Fluconazol sehr ähneln. Interessant dabei ist vor allem, dass neben vielen weiteren Genen vor allem 13 Gene mit direkter Funktion in der Ergosterol-Synthese sowie die Regulation eines Transkriptionsfaktor dieser Biosynthese *UPC2* übereinstimmen. Beim Vergleich der beiden Benzimidazole EMC120B12 mit Nocodazol hingegen gibt es kaum Übereinstimmungen. Die wenigen übereinstimmenden Gene sind vorwiegend auf die Stressantwort der Pilzzelle auf das Antimykotikum zurückzuführen. Der Unterschied in der Interaktion der beiden Benzimidazole in der Zelle ist dadurch ebenfalls eindeutig gezeigt. Nach einer Behandlung mit EMC120B12 ist kein Effekt auf Mikrotubuli assoziierte Gene zu finden. Dies gleicht ebenfalls den Daten zu Fluconazol. Im Gegensatz dazu sind nach der Nocodazol-Behandlung Gene hoch reguliert, die mit den Mikrotubuli und dem Zytoskelett in Verbindung gebracht werden. Alle Daten zum Vergleich der Transkriptionsprofile sind in Tabelle 14 aufgeführt. Zudem fasst Abbildung 25

zusammen, welche Wirkorte den Substanzen anhand der Transkriptdaten zugeordnet werden können. EMC120B12 verhält sich nach den Transkriptdaten im Bezug auf den Wirkort nicht wie ein Benzimidazol und lässt den sicheren Schluss zu, dass es ein Inhibitor der Ergosterol-Synthese ist.

#### **4.3.2 Immunfluoreszenz von *C. albicans*-Tubulin**

Um die Auswirkung einer Nocodazol-Behandlung auf das Tubulin in den Zellen im Vergleich zu EMC120B12 und auch zu Fluconazol auf zellbiologischer Ebene sichtbar darzustellen, wurden Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt. Diese visuelle Darstellung diente zudem zur Überprüfung der Ergebnisse der Transkriptionsanalysen. Es sollte so untersucht werden, ob nicht nur die Tubulin-assoziierten Gene eine Reaktion auf Nocodazol und keine Reaktion auf EMC120B12 und Fluconazol zeigen, sondern dass dies auch keine Veränderung auf Proteinebene nach sich zieht. Die Ergebnisse der vom Transkriptom unabhängigen Methode zeigten, dass auch auf Zellebene keine Interaktion von EMC120B12 mit den Mikrotubuli zu sehen ist und es sowohl für das Benzimidazol EMC120B12 als auch für Fluconazol keine erkennbaren Effekte auf Tubulinstrukturen gibt. In Abbildung 26 ist dies im Gegensatz zum Effekt von Nocodazol auf das Tubulin in den Zellen visuell sehr gut zu erkennen. Nocodazol behandelte Zellen weisen eine gestörte Zellform und Zellteilung auf. Es sind keine klaren Tubulinstrukturen zu erkennen. Das bestätigt die Daten der Transkriptionsprofile und stimmt auch mit der Literatur über den Effekt von Benzimidazolen auf Tubulin überein. Die Arbeitsgruppe um Li und die Arbeit von Kunkel beschreiben eben diesen Effekt von Benzimidazolen auf das Tubulin (Li et al., 1996; Kunkel, 1980; Kilmartin et al., 1982; Kilmartin und Adams, 1984). Der Effekt ist somit nicht nur auf Transkript-Ebene zu sehen, sondern ist auch auf Proteinebene zu finden und kann in der Zelle sichtbar gemacht werden.

#### **4.3.3 EMC120B12 in komplexen *in vitro* Hautmodellen**

Neben der direkten antimykotischen Wirkung auf den Pilz wurden in dieser Arbeit weitere wichtige Eigenschaften des potentiellen Wirkstoffs untersucht. Um Aussagen über die Verträglichkeit, die Gewebegängigkeit und die Effektivität von EMC120B12 im Vergleich mit anderen Wirkstoffen zulassen, wurden Tests mit komplexen *in vitro* 3D-Hautmodellen mit Darmepithelzellen durchgeführt. Mit diesen Gewebemodellen konnte getestet werden, ob EMC120B12 in der Lage ist Gewebe und ebenso Membranen zu durchdringen. Dieser Versuch wurde in ähnlicher Weise bei Burger-

Kentischer et al. durchgeführt (Burger-Kentischer et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch andere Konzentrationen getestet und zusätzlich mit weiteren *Candida*-Spezies, über *C. albicans* hinaus, gearbeitet. Die *in vitro* 3D-Modelle sollten dabei Aussagen über das invasive Verhalten der zuvor im AS-HTS-Assay adaptierten und getesteten *Candida*-Spezies im komplexen Hautmodell geben (siehe 3.5).

Im AS-HTS-Screening wurde EMC120B12 bereits auf einem Monolayer aus Humanzellen untersucht. Die Verträglichkeit auch nach 5-tägiger Inkubation von EMC120B12 war sehr gut und mit den Daten des Referenz-Antimykotikum Amphotericin B vergleichbar (siehe 3.1 und 3.2 und Abbildung 11). Die Ergebnisse aus den Arbeiten von Dieterich und Burger Kentischer dienten als Grundlage der Bewertung der mikroskopierten Gewebeschnitte der Hautmodelle in dieser Arbeit (Dieterich et al., 2002; Burger-Kentischer et al., 2011). Die mikroskopischen Aufnahmen der P.A.S. gefärbten Gewebeschnitte beweisen, dass EMC120B12 sowohl auf einen Humanzell-Monolayer, wie im AS-HTS-Screening, als auch auf Humanzellen in einem komplexen Modell keine zytotoxischen Effekte hat (siehe 3.5 Abbildung 20: Caco-2, EMC120B12). In der Anwesenheit von EMC120B12 proliferiert *C. albicans* kaum und dringt nicht in das Gewebe ein. Die Schnitte nach Inkubation mit EMC120B12 sind ähnlich der Kontrolle mit Amphotericin B (siehe 3.5 Abbildung 20 Caco-2 + *C. albicans*, Ampho B). Bei beiden Proben sind die Humanzellen intakt und gleichen der Humanzellkontrolle ohne jegliche Zugabe von Substanzen (siehe 3.5 Abbildung 20 Caco-2). Dies zeigt, dass EMC120B12 sogar fähig ist durch die Kollagenschicht und die Humanzellen hindurch einen Effekt auf das Wachstum des Pilzes sogar an der Oberfläche des Gewebemodells zu haben. Es ist zudem im Vergleich mit Amphotericin B gezeigt, dass der antimykotische Effekt auf *C. albicans* und die Effektivität von EMC120B12 (siehe 3.5 Abbildung 20 Caco-2 + *C. albicans*, EMC120B12) mit dem eines gängigen Antimykotikums vergleichbar ist (siehe 3.5 Abbildung 20 Caco-2 + *C. albicans*, Ampho B).

Dadurch konnte eindeutig die Gewebegängigkeit, die Bioverfügbarkeit und die Verträglichkeit von EMC120B12 in einem komplexen Epithelmodell bestätigt werden. Die Effektivität und der antimykotische Effekt nach einer Infektion mit *C. albicans* konnte ebenfalls gezeigt werden. In Abbildung 20 ist deutlich das reduzierte Wachstum der *Candida*-Zellen und zudem eine intakte Humanzellschicht zu erkennen (siehe 3.5 Abbildung 20 Caco-2 + *C. albicans*).

Die zuvor im AS-HTS-Assay adaptierten und getesteten *Candida*-Spezies (siehe 3.3.1) wurden auf gleiche Weise wie *C. albicans* im Gewebemodell eingesetzt. Durch die erfolgreiche Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes für *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* konnte der Effekt von EMC120B12 auf ein *in vitro* 3D-Modell mit Darmepithelzellen auch mit *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* getestet werden. So konnten Aussagen über deren Reaktion auf EMC120B12 und das invasive Verhalten der beiden Hefen in diesem komplexen System gemacht werden. Wie Abbildung 21 zeigt, sind Unterschiede im Invasionsverhalten von *C. dubliniensis* in An- und Abwesenheit von EMC120B12 eindeutig zu erkennen. Nach Zugabe von EMC120B12 sind keine Einschlüsse von Pilzzellen im Gewebe zu sehen (siehe 3.5 Abbildung 21 Caco-2 + *C. dubliniensis*, EMC120B12), welche in der Infektionskontrolle ohne jegliche antimykotische Substanz vorhanden sind (siehe 3.5 Abbildung 21 Caco-2 + *C. dubliniensis*). Die Ergebnisse nach Behandlung mit EMC120B12 gleichen denen der Kontrolle mit Fluconazol. Hier konnte ebenfalls ein wachstumshemmender Effekt auf *C. dubliniensis* gezeigt werden (siehe 3.5 Abbildung 21 Caco-2 + *C. dubliniensis*, Fluconazol). In dieser Arbeit konnte somit erstmals die Wirksamkeit und die Effizienz von EMC120B12 in einem 3D-Hautmodell nach Infektion mit *C. dubliniensis* in mehreren Replikaten gezeigt werden.

Auch für *C. tropicalis* wurden das erste Mal Versuche mit EMC120B12 im komplexen Hautmodell gemacht. Bei den Schnitten konnten jedoch keine sichtbaren Unterschiede im Invasionsverhalten von *C. tropicalis* in An- und Abwesenheit der Substanz erkannt werden (Abbildung 22). Auch in mehreren Replikaten war leider kein eindeutiges Ergebnis reproduzierbar. Die Kontrollen waren denen der anderen Ansätze mit *C. albicans* und *C. dubliniensis* gleich und zeigten kein anderes Ergebnis.

Um zu überprüfen, ob, und gegebenenfalls wie, *C. glabrata*, eine Hefe ohne invasives Hyphenwachstum, in innere Gewebeschichten eines Wirtes vordringen kann, wurde auch für diese *Candida*-Spezies ein entsprechender Invasion-Assay angesetzt. Beim AS-HTS-Screening wurde bereits gezeigt, dass *C. glabrata* nicht als Pathogen für den Einsatz im Assay adaptiert werden konnte (siehe 3.5). Für die 3D-Hautmodelle wurden neben aktiven *C. glabrata*-Zellen auch hitzeinaktivierte Zellen getestet. Dies diente zur Unterscheidung, ob dem Eindringen der Pilzzellen in die Hautschicht ein aktiver Vorgang zugrunde liegt oder, ob möglicherweise ein durch das Schneiden der Epithelmodelle entstehendes Artefakt die Ursache für in Zellschicht und Kollagen befindliche Pilzzellen ist. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, konnten für diese *Candida*-

Spezies ohne hyphales Wachstum im 3D-Infektionsmodell keine auswertbaren Ergebnisse produziert werden. Durch Mikroskopie der Insertmembranen unterhalb der Kollagen-Matrix konnte gezeigt werden, dass die *C. glabrata*-Zellen auf diesen Membranen zu finden sind (nicht gezeigt). Dies könnte durch das Fehlen des invasiven Hyphenwachstums oder einer zu schwachen Adhäsion an die Zellschicht bedingt sein. Zudem könnte die geringere Größe der einzelnen *C. glabrata* Zellen (1-3  $\mu\text{m}$ ) im Gegensatz zu *C. albicans* (3-6  $\mu\text{m}$ ) eine Rolle spielen. So könnten die *C. glabrata*-Zellen durch die geringe Größe zwischen Insertwand und Kollagen nach unten gerutscht sein.

Mit diesem Versuch sollte außerdem die mögliche Fähigkeit zur Endozytose der Zelllinie TR146 untersucht werden (Dalle et al., 2010). Mit den Gewebeschnitten sollte überprüft werden, ob eine Aufnahme der Pilzzellen in die Humanzellen sichtbar gemacht werden kann. Mehrere Replikate zeigten das gleiche Bild. Es konnten keine *C. glabrata*-Zellen auf oder in den Humanzellschichten gefunden werden. Doch in einer Probe war deutlich zu sehen, dass sich *C. glabrata*-Zellen in TR146-Zellen befanden, was den Membrantransport durch Endozytose widerspiegeln könnte (Abbildung 23b und 23c). Neben den hier verwendeten 3D-Hautmodellen wurden von einem Projektpartner ebenfalls Tests mit EMC120B12 im Nematodenmodell durchgeführt. Vom Universitätsklinikum Tübingen wurde das Modell für diese Zwecke adaptiert und erfolgreich eingesetzt. Auch im Nematodenmodell konnte der antimykotische Effekt von EMC120B12 eindeutig gezeigt werden (Daten nicht publiziert). Die nächste Stufe in Richtung Wirkstoff wäre nun EMC120B12 im Mausmodell zu testen. Dadurch könnten weitere Daten über dieses Benzimidazol in einem komplexen Organismus erhalten werden.

#### **4.3.4 MHK-Bestimmung mittels EUCAST im Vergleich zum AS-HTS-Assay**

Um die Ergebnisse des Activity-Selectivity (AS)-Assay und die damit erfolgreich bestimmten  $\text{IC}_{50}$ -Werte zu verifizieren wurde der Assay mit konventionellen Methoden zur Bestimmung des MHK-Wertes zu vergleichen. Dafür wurden für alle im AS-Assay eingesetzten Pilz-Stämme eine Bestimmung der MHK mittels des EUCAST-Protokolls durchgeführt (EUCAST, 2008). Die Ergebnisse waren miteinander vergleichbar (3.4) und bestätigen die Genauigkeit des AS-Assay, der somit eine Alternative zu konventionellen Methoden darstellt.

Fast alle *C. albicans*-Stämme, die innerhalb der EUCAST-Sensitivitätstests untersucht wurden, zeigten entweder ein resistentes oder sensitives Verhalten gegenüber EMC120B12 und gegen Fluconazol. Die Ergebnisse zeigten erneut, dass die neue antimykotische Substanz nicht nur auf den *C. albicans* Wildtyp wirkt, sondern das EMC120B12 gegen ein breites Spektrum an klinisch relevanten *Candida*-Spezies eingesetzt werden kann.

Äußerst interessant waren die Untersuchungen der Wirkung von EMC120B12 auf *C. krusei*-Isolate. Diese zeigten eine höhere Sensitivität gegenüber EMC120B12 als gegen Fluconazol. Für den *C. krusei* Wildtyp lag die MHK für Fluconazol bei 64 µg/ml und für EMC120B12 bei 2 µg/ml. *C. krusei* besitzt eine Multidrug-Resistenz und ist bekannter weise intrinsisch resistent gegen Azole (Lupetti et al, 2002; Pfaller et al., 2008; Orozco, 1998). Daher könnte EMC120B12 einen interessanten und wichtigen alternativen Wirkstoff gegen dieses Pathogen darstellen. Wie in dieser Arbeit durch Transkriptionsprofile und Immunofluoreszenz-Aufnahmen bewiesen wurde, interagieren Azole und EMC120B12 im selben Biosyntheseweg des Pilzes. Interessant war daher herauszufinden, welche Wirkung EMC120B12 auf *C. krusei* hat und was, trotz des gleichen Wirkortes in der Pilzzelle, die große Differenz der MHK-Werte im Vergleich zu Fluconazol verursacht.

#### **4.3.5 GC/MS-Analysen der Sterolmuster von *Candida* spp.**

Eine Azol-Resistenz in *C. albicans* ist meist ein Zusammenspiel aus verschiedenen Ereignissen. Die Transport-Aktivität der Efflux-Pumpen können sich ändern und ebenso die Expression regulatorischer Gene und Gene der Ergosterol-Biosynthese (Kanafani und Perfect, 2008; Sanglard und Odds, 2002). Dass sowohl Azole als auch EMC120B12 auf sehr ähnliche Weise reagieren und der Ergosterol-Biosyntheseweg der Angriffspunkt beider Substanzen ist, wurde bereits gezeigt. Der Unterschied in der Reaktion eines Fluconazol-resistenten Stammes wie *C. krusei* lässt erkennen, dass die Interaktion zwar im selben Syntheseweg stattfindet, aber nicht komplett identisch ist. Um das genaue molekulare Ziel und die Wirkungsweise von EMC120B12 in der Pilzzelle zu identifizieren und mit dem der Azole zu vergleichen, diente die biochemische Analyse der Sterolmuster der *Candida*-Zellen. Es wurden verschiedene *Candida*-Stämme und -Spezies nach Behandlungen mit Fluconazol, EMC120B12 und Nocodazol miteinander und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

Die Abnahme von Ergosterol und die Zunahme von abberanten Sterolformen haben einen signifikanten Einfluss auf die Fitness des Pilzes (Pfaller und Diekema, 2007; Odds, 2010; Lupetti et al., 2002; Kelly et al., 1997). An der LMU München hat der Projektpartner Bracher und seine Arbeitsgruppe Sterolmuster nach Azol-Behandlung für andere Pilze bereits erfolgreich messen können. Darunter waren *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica* (Müller et al., 2013) In der vorliegenden Arbeit konnte der verwendete Zellaufschluss nach Müller et al. optimiert und an hyphenbildende Pilze angepasst werden. So konnten die Sterolmuster weiterer Pilz-Spezies mit hyphalem Wachstum untersucht werden. Die so durchgeführten Sterolanalysen von *C. albicans* und *C. krusei* dienten zur Eingrenzung des Wirkortes, zur Bestimmung des Angriffspunktes von EMC120B12 in der Pilzzelle und zudem zur Untersuchung der Unterschiede in der Wirkung von Azolen und von EMC120B12 (siehe Abbildung 30 bis Abbildung 32). Da ein Peak der akkumulierenden Sterole oft mehrere Ionen mit verschiedenen Massen enthält und die Peakhöhe der Rohdaten nicht immer äquivalent zur Menge des akkumulierenden Sterols ist, wurde die Auswertungsmethode der GC/MS-Daten in dieser Arbeit optimiert. Durch die Aufarbeitung der Rohdaten und durch Extraktion der Qualifier-Ionen konnte eine bessere Interpretation der erhaltenen Sterolmuster erfolgen. Dies war nötig, da mehrere im Peak verdeckte Sterole die Peakhöhe beeinflussen können. Durch das Extrahieren der Ionen wurde die Basislinie der Chromatogramme geglättet und störende Hintergrundsignale wurden minimiert. Trotzdem ist jedes Sterol eindeutig durch dieser Qualifier-Ionen identifizierbar und die Peaks sind direkt proportional zu der Menge des jeweiligen Sterols. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass Sterole oft sogar erst durch den Einsatz der optimierten Auswertung in den Proben eindeutig identifizierbar sind. In Abbildung 28 ist dies für Eburicol gezeigt.

#### **4.3.5.1 GC/MS-Analysen der Sterolmuster von *C. albicans***

Die *C. albicans*-Stämme, die innerhalb der EUCAST-Sensitivitätstests untersucht wurden, zeigten entweder ein resistentes oder ein sensitives Verhalten gegenüber beiden Testsubstanzen. Zur Analyse der dahinter stehenden Wirkmechanismen wurden daher die Sterolmuster des gegen Fluconazol und EMC120B12 sensitiven Stammes *C. albicans* SC5314 (Can14, Wildtyp) und des Fluconazol-resistenten Isolates Can741 durchgeführt.



Wie durch die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, liegen das Zielenzym oder die Zielenzyme von Fluconazol und EMC120B12 im Post-Lanosterol-Teil der Ergosterol-Biosynthese. Es ist bekannt, dass in Folge einer Inhibition der C14-Demethylase das letzte noch gebildete Zwischenprodukt Lanosterol ist. Dieses Sterol, das normalerweise von der C14-Demethylase in 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol umgesetzt wird, akkumuliert bei einer Inhibition (Akins, 2005). Des Weiteren akkumulieren Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Diese Sterole sind keine Bestandteile der natürlichen Ergosterol-Synthese. Eburicol wird von der C24-Methyltransferase (Erg6) umgesetzt und entsteht dabei direkt aus Lanosterol. Der Inhibitionsmarker 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol hingegen entsteht aus einer Reihe von Umsetzungsreaktionen, an denen sowohl die C5-Desaturase (Erg3) als auch der C4-Demethylase-Komplex (Erg25 / Erg26 / Erg27) beteiligt sind. (Martel et al., 2010; Martel und Parker et al., 2010). Abbildung 36 zeigt diese erweiterte Ergosterol-Biosynthese.

Betrachtet man nun das Sterolmuster des gegen Fluconazol und EMC120B12 sensitiven Stammes Can14, so zeigt dieser nach Behandlung mit Fluconazol eine Akkumulation von Lanosterol, Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Die Behandlung mit EMC120B12 resultiert in dem gleichen Sterolmuster. Auch hier akkumulieren diese drei typischen 14 $\alpha$ -Methyl-Sterole. In der unbehandelten Kontrolle stellt Ergosterol mit über 75 % den größten Anteil an Sterole dar. Darüber hinaus sind in dieser Probe nur wenige Zwischenprodukte der natürlichen Synthese in geringen Mengen zu finden (Abbildung 30). Dies zeigt zum ersten Mal, dass der Wirkung von Fluconazol aber auch der Wirkung von EMC120B12 eine Störung der C14-Demethylase zugrunde liegt. Somit wurde bewiesen, dass EMC120B12 dasselbe Zielenzym in der Zelle angreift, wie Fluconazol oder andere Azole.

Weiterhin wurde der resistente Stamm Can741 mit Fluconazol und EMC120B12 getestet. Die Ursache für diese Resistenz und der zugrundeliegende Mechanismus dieses Stammes sind nicht bekannt. Die unbehandelte Kontrolle von Can741 bildet ohne Einschränkung Ergosterol aus und zudem sind ebenfalls geringe Mengen an Lanosterol und weiteren Zwischenprodukten der natürlichen Biosynthese zu finden. Behandelt man die Zellen mit Fluconazol und EMC120B12 so waren sehr hohe Konzentrationen der beiden Inhibitoren nötig, um eine Veränderung im Sterolmuster zu initiieren.

Eine Behandlung mit 4 µg/ml EMC120B12 führte zu keiner Reduktion des Ergosterol-Gehaltes. Der Inhibitionsmarker 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol war jedoch in geringen Mengen detektierbar. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Lanosterol-Konzentration konstant. Bei der Zugabe von 2 µg/ml Fluconazol waren keine Unterschiede zu der unbehandelten Kontrolle erkennbar. Dies bestätigt das Ergebnis der MHK-Messung für den Azol-resistenten *C. albicans*-Stamm Can741. Erst nach Zugabe einer höheren Konzentration von Fluconazol (32 µg/ml) sind ein inhibitorischer Effekt und eine Veränderung des Sterolmusters zu erkennen. Dies ist auch nach einer Behandlung mit 16 µg/ml EMC120B12 zu beobachten (Abbildung 30). Behandelt man die Zellen mit 32 µg/ml Fluconazol nehmen Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol mehr zu, Lanosterol nimmt mehr ab und es wird zudem ein weiteres Zwischenprodukt der Synthese das 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3β,6α-diol (Sterol 5) gebildet. Dieses Sterol konnte mittels der verwendeten Auswertungsmethode über die relative Retentionszeit (RRT) eindeutig als 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3β,6α-diol identifiziert werden (kalkulierte RRT 1,49). Für die anderen nach Masse optionalen Sterole sind die RRTs kürzer. Sterol 5 kann auch nach Behandlung mit 16 µg/ml EMC120B12 detektiert werden. Im Vergleich zu der Fluconazol-Behandlung ist bei 16 µg/ml EMC120B12 zudem eine Zunahme von Eburicol und 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol messbar. Diese Anreicherung konnte bei 4 µg/ml EMC120B12 nicht detektiert werden (Abbildung 30). Die höhere Konzentration beider Wirkstoffe (Fluconazol 32 µg/ml und EMC120B12 16 µg/ml) hat bei dem resistenten Stamm eine Hemmung der Ergosterolproduktion in der Pilzzelle zur Folge und es können nur noch geringe Mengen des Endproduktes der Synthese detektiert werden.

Wie Akins (2005) aufzeigt, ist das für Fluconazol bekannte Zielenzym in der Zelle die Lanosterol-Demethylase (Erg11p). Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit ist nach einer Fluconazol-Behandlung die Inhibition dieses Enzyms eindeutig erkennbar. Die Sterolmuster dieser Arbeit zeigen, wie für eine Hemmung von Erg11p bei Akins beschrieben, eindeutig die Akkumulation des Marker-Sterols 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol und aller weiteren zu erwartenden Zwischenprodukte, sowie eine stark verminderte Menge an Ergosterol.

Interessant sind die neuen Erkenntnisse aus den Sterolanalysen nach einer Behandlung mit EMC120B12. Die Sterolmuster sind, bis auf kleine Verschiebungen in den Verhältnissen der einzelnen Sterole, kaum vom Chromatogramm von Fluconazol

zu unterscheiden (Abbildung 30). Hier nimmt Ergosterol ebenfalls ab und es ist ebenso eindeutig das Marker-Sterol 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol detektierbar. Zudem sind die gleichen Sterole zu finden, wie dies bei den Proben von Fluconazol der Fall ist. Es kommt zu einer Akkumulation von C14-methylierten-Sterolen, wobei 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol in höheren Konzentrationen bei EMC120B12 im Vergleich zu Fluconazol-Proben akkumuliert. Zudem sind Lanosterol, Eburicol, und Sterol 5 in beiden Proben zu finden.

Mit diesen Ergebnissen zu *C. albicans* ist klar, dass EMC120B12 die Lanosterol-Demethylase (Erg11p) angreift und somit dasselbe Enzym wie Fluconazol in der Ergosterol-Biosynthese inhibiert. Das ist das erste Mal, dass dies für ein Benzimidazol-Derivat gezeigt werden konnte. Die Sterolmuster sind denen in dieser Arbeit für Fluconazol gezeigten Daten sehr ähnlich und die gleichen Sterole akkumulieren bei beiden Wirkstoffen. Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition an derselben Stelle in der Synthese stattfindet. Auch bei weiteren *C. albicans* Stämmen, die in Laufe dieser Arbeit getestet wurden, gab es diese Übereinstimmungen (Daten nicht gezeigt).

Der äußerst interessante Unterschied zwischen den Ergebnissen zu EMC120B12 und Fluconazol besteht darin, dass die Pilzzellen nur mit der halb so hohen Konzentration an EMC120B12 im Vergleich zum Azol Fluconazol behandelt werden müssen, um einen ähnlich starken Hemmeffekt zu bewirken. Dies differenziert EMC120B12 nochmals von den Azolen, auch wenn das Zielenzym, nach Auswertung der Proben für *C. albicans*, dasselbe ist. Dies weist darauf hin, dass bestimmte *Candida* spp. möglicherweise etwas anders oder sensitiver auf EMC120B12 als auf Fluconazol reagieren oder die Bindung der Substanz an das Zielenzym stärker ist als bei Azolen.

Nach Inkubation der Pilzzellen mit dem Benzimidazol Nocodazol sind sowohl bei *C. albicans* als auch *C. krusei* die Sterole Ergosterol, Lanosterol sowie kleine Mengen an Vorstufen und Zwischenprodukte der Synthese des Ergosterol, eindeutig detektierbar (Abbildung 29). Es gibt keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Dass Nocodazol keinen Einfluss auf die Ergosterol-Synthese hat, ist schon bei Li et al., 1996 und Kunkel, 1980 beschrieben. Die Proben dieser Arbeit bestätigen dies und sichern zudem die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen und Immunfluoreszenzaufnahmen ab. Mit den Steroldaten für *C. albicans* konnte ebenfalls gezeigt werden, wie sich ein Sterolmuster nach Inkubation mit einem Benzimidazol darstellt. Vergleicht man die Daten von Nocodazol und EMC1230B12 ist

der Unterschied zwischen den Benzimidazolen eindeutig zu erkennen. Die EMC120B12-Proben zeigen eindeutig ein anderes Sterolmuster als die Nocodazol-Proben.

#### **4.3.5.2 GC/MS-Analysen der Sterolmuster von *C. krusei***

*C. krusei* besitzt eine intrinsische Resistenz gegenüber Azolen. Das Target der Azole, die C14-Demethylase, wird auch als P450-Lanosterol-Demethylase bezeichnet, da es sich dabei um ein Cytochrom P450-Enzym handelt. Eine Analyse der Resistenzmechanismen von *C. krusei* von der Arbeitsgruppe um Orozco ergab, dass der Gehalt an Cytochrom P450 in dem Organismus ähnlich dem in *C. albicans* ist. Auch die intrazelluläre Akkumulation des Wirkstoffs Fluconazol war ähnlich, wenn nicht sogar stärker, als in *C. albicans*. Es wurden allerdings signifikante qualitative Unterschiede zwischen der C14-Demethylase in *C. krusei* und der in *C. albicans* festgestellt. Die Fluconazol-Resistenz scheint also überwiegend durch eine reduzierte Sensitivität der C14-Demethylase gegenüber der Hemmung durch den Wirkstoff vermittelt zu werden (Lupetti et al, 2002; Pfaller et al, 2008; Orozco et al., 1998). Dieser Mechanismus spricht dafür, dass EMC120B12 entweder andere Bindungseigenschaften als die typischen Azole besitzt und somit effektiver an das Target binden kann, oder, dass die Substanz gar nicht direkt an das Enzym C14-Demethylase bindet, sondern andere Targets inhibiert.

Die Versuche zur Bestimmung des MHK-Wertes mit den Azol-resistenten *C. krusei*-Isolaten zeigte eine hohe Sensitivität des Pilzes gegenüber EMC120B12. Daher wurde das Sterolmuster des *C. krusei* Wildtyps in An- und Abwesenheit von Fluconazol und EMC120B12 genau untersucht. Alle Proben, die mit Fluconazol behandelt wurden, zeigten dasselbe Muster. Es kam zu einer Anhäufung von Ergosterol (meist 90 %). Andere Sterole akkumulierten hingegen nicht in signifikanten Mengen. Lediglich etwas Lanosterol und teilweise etwas Eburicol konnten nachgewiesen werden (Abbildung 31, A2 und A3). Dies ist aber keine Akkumulation durch eine Inhibition eines Enzyms, sondern die beiden Sterole können in diesen Mengen als Durchlaufprodukt der Synthese von Ergosterol angesehen werden. Die Behandlung der Zellen mit einer niedrigen Konzentration EMC120B12 (0,5 µg/ml) ergab ein ähnliches Bild. Der Unterschied war jedoch, dass der Ergosterolgehalt bereits deutlich abnahm (50-70 %) und es akkumulierte das für eine Azol-Hemmung typische Marker-Sterol 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Abbildung 31, B1). Dies entspricht den unter

3.4 gezeigten MHK-Daten. Bei der gleichen Konzentration Fluconazol (0,5 µg/ml) (A2) war die Sterolzusammensetzung im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert (A1) und die Ergosterol-Synthese ist nicht beeinträchtigt.

Wie stark EMC120B12 dagegen auf *C. krusei* wirkt, ist bei einer Behandlung mit 1 µg/ml EMC120B12 erkennbar. Hier konnte kaum noch synthetisiertes Ergosterol gemessen werden. Zudem sind die für eine Inhibition der Lanosterol-Demethylase typischen Sterole 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol und Eburicol, sowie etwas Lanosterol detektierbar. Das Markersterol stellte das Hauptsterol dar und entsprach etwa 60 % der Gesamtmenge der Sterole (Abbildung 31, B2). Bei 32 µg/ml Fluconazol (A3) sind auch nach einer Behandlung mit diesem Wirkstoff erste relevante Veränderungen im Sterolmuster zu sehen. Es sind neben Ergosterol kleine Mengen anderer Sterole detektierbar, die Ergosterolmenge ist aber ebenso nicht beeinträchtigt.

Betrachtet man *C. krusei* nach einer Behandlung von 16 µg/ml EMC120B12, entspricht dies dem Sterolmuster von 4 µg/ml EMC120B12, doch konnten zusätzlich zwei neue, unbekannte Sterole detektiert werden. Die Peaks zu den Sterolen konnten laut Datenbanken (Datenbank Labor Bracher, NIST™-Datenbank und Daten aus der Literatur, wie unter Müller et al., 2013 beschrieben) keinem bekannten Sterol zugeordnet werden und sind bisher nicht in der Literatur beschrieben. Beide Verbindungen konnten eindeutig als 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3β,6α-diol (Sterol 6) als und 14-Methylergosta-8,22-dien-3β,6α-diol (Sterol 7) identifiziert werden. Diese beiden Sterole wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal detektiert und identifiziert. Zuvor gab es keine Erwähnung in der Literatur oder Referenzbibliotheken zur Sterolanalyse. Beide neuen Sterole besitzen eine 3β,6α-diol-Struktur und konnten als Derivate von 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol (Marker-Sterol) zugeordnet werden. Das Massenspektrum von 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol würde ebenso die Option 14-Methylergosta-8,22-dien-3β,6α-diol (Sterol 7) oder 14-Methylergosta-7,22-dien-3β,6α-diol erlauben. Die eindeutige Unterscheidung der drei Sterole erfolgt aber durch die relative Retentionszeit. Bei  $\Delta^{7,22}$  und  $\Delta^{7,24}$ -Sterolen sind die RRTs signifikant verschieden und die RRT erlaubt eine sehr korrekte Lokalisierung der Doppelbindung im Sterol (Übersicht in Tabelle 15 und Tabelle 16, verändert nach Keller et al., 2015). Durch diese Vorgehensweise konnte auch Sterol 16 als 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3β-ol und Sterol 5 als 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3β,6α-diol eindeutig identifiziert werden. Von Sterol 5 konnten nach einer Behandlung mit EMC120B12 ebenfalls bei *C. krusei* geringe Mengen gefunden

werden. Dieses Sterol ist bei *C. krusei* in den bis dahin getesteten Konzentrationen an Fluconazol nicht detektiert worden. Aus den Daten lässt sich schließen, dass *C. krusei* anders auf die Behandlung mit EMC120B12 als auf die Behandlung mit Azolen reagiert.

Bei einer Fluconazol-Konzentration von 256 µg/ml konnten interessanterweise diese beiden neuen Sterole 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3β,6α-diol (Sterol 6) und 14-Methylergosta-8,22-dien-3β,6α-diol (Sterol 7) ebenfalls detektiert werden. Diese Konzentration des Wirkstoffes ist jedoch nicht von klinischer Relevanz und wird bei Behandlungen von Menschen und Tieren nicht eingesetzt. *C. krusei* zeigt jedoch nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 256 µg/ml Fluconazol ein vergleichbares Sterolmuster wie nach einer Behandlung mit 1 µg/ml EMC120B12. Das Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen zur MHK-Bestimmung überein. In Abbildung 35 sind die Sterolmuster von *C. krusei* nach Behandlung mit 256 µg/ml Fluconazol und 1 µg/ml EMC120B12 nebeneinander dargestellt. Die Ähnlichkeit der Sterolmuster ist eindeutig erkennbar. Der Ergosterolgehalt ist im Vergleich zu einer unbehandelten Probe deutlich reduziert und Sterole 6 und 7 sind bei beiden Behandlungen detektierbar. Trotzdem ist die Inhibition mit sogar nur 1 µg/ml EMC120B12 stärker als bei 256 µg/ml Fluconazol. Das Sterolmuster nach der Behandlung mit 1024 µg/ml Fluconazol ist mit dem von 16 µg/ml EMC120B12 genauso vergleichbar (Daten nicht gezeigt), wie das von 256 µg/ml Fluconazol mit dem Muster nach Behandlung mit 1 µg/ml EMC120B12. Ergosterol ist nicht detektierbar, darüber hinaus sind jedoch dieselben Sterole auch in diesen extrem hohen Konzentrationen zu finden. Diese Ergebnisse zeigen wiederum, dass der Wirkmechanismus von Fluconazol und EMC120B12 sehr ähnlich ist. EMC120B12 inhibiert jedoch auf noch ungeklärte Weise das Enzym wesentlich effektiver und wirksamer als Fluconazol und so entspricht das Sterolmuster von 256 mg/ml Fluconazol dem von 1 µg/ml EMC120B12. Es ist eine klinisch absolut irrelevante Konzentration an Fluconazol nötig, um den gleichen inhibierenden Effekt zu sehen, wie dies für eine geringe, im Hautmodell nicht toxische, Menge an EMC120B12 der Fall ist. Auch trotz der sehr hohen Konzentrationen an Fluconazol ist die Hemmung mit EMC120B12 in den geringen Konzentrationen sogar noch stärker. Nach der Behandlung mit der geringen Dosis der neuen antimykotischen Substanz ist eindeutig weniger Ergosterol detektierbar, als nach Verwendung der humantoxischen Konzentrationen an Fluconazol. Aus dieser hohen Effektivität

resultiert ein weiterer Vorteil von EMC120B12 gegenüber dem gängigen Antimykotikum Fluconazol.

Betrachtet man alle Ergebnisse der Sterolanalysen von *C. krusei* zusammen, so ist die Ähnlichkeit der Sterolmuster für Fluconazol und EMC120B12 eindeutig zu erkennen. Der Unterschied beruht rein auf der benötigten Konzentration der Substanzen.

Diese Ergebnisse und die Analysen von *C. albicans* lassen den Schluss zu, dass beide Substanzen sicher denselben Wirkort und dasselbe Zielenzym in der Zelle haben. Beide greifen Erg11p an. EMC120B12 ist daher, wie die Triazole, ein Inhibitor des Enzyms Lanosterol-Demethylase. Allerdings konnte bislang nicht bewiesen werden, ob EMC120B12, ebenso wie die Azole, direkt an das Enzym bindet oder auf anderem Wege eine Hemmung des Enzyms hervorruft.

Zudem konnte in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt werden, dass eine Benzimidazol-Struktur in den Ergosterol-Biosyntheseweg eingreift und dort ein Enzym inhibiert. Der Wirkort von EMC120B12 konnte eindeutig identifiziert werden. Der hier eindeutig gezeigte Unterschied zu Fluconazol liegt in der weitaus höheren Effektivität von EMC120B12. Es ist stärker wirksam und für einen gleichen Effekt muss eine geringere Menge an Substanz eingesetzt werden. In den Sterolmustern ist häufig die Akkumulation ähnlicher Sterole zu beobachten, die sich lediglich durch minimale Strukturveränderungen wie die Verschiebung oder der Anzahl einer Doppelbindung von den natürlichen Sterolen unterscheiden. Dies ist bei 4,4,14-Trimethylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol im Vergleich zu Eburicol der Fall. In der Arbeitsgruppe um Fan konnten ebenfalls zwei Ergosterol-Vorstufen mit einer 4,4,14-Trimethyl-Struktur detektiert werden (Fan et al., 2013). Hierfür stehen leider keine MS-Daten zur Verfügung. Es könnte sich aber ebenfalls um das in dieser Arbeit nachgewiesene 4,4,14-Trimethylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (Sterol 16) handeln.

Die Bestimmung der Doppelbindungen und damit der Sterole, nach der in dieser Arbeit verwendeten Methode, stimmen in allen anderen Fällen mit der Literatur überein. Das optimierte System dieser Arbeit zur Auswertung der Sterolanalyse eignet sich folglich sehr gut zur Identifizierung der molekularen Targets von Inhibitoren der Sterolbiosynthese. Es ist ein wertvolles Werkzeug um neue Wirkstoffe gegen humanpathogene Pilze zu charakterisieren.

Mit diesen Ergebnissen der Sterolanalysen nach EMC120B12-Behandlung lässt sich der Syntheseweg nach Inhibition EMC120B12 weiter verstehen. Diese Arbeit und die

Sterolanalysen ermöglichen es somit, den Ergosterol-Biosyntheseweg nach einer Inkubation mit EMC120B12 aufzuzeigen. Es ist möglich den Syntheseweg mit allen entstehenden Zwischenprodukten darzustellen, sowie die neu identifizierten Sterole, als Derivate des Marker-Sterols 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol in die Ergosterol-Biosynthese einzuordnen. Der vermutete Syntheseweg und die Einordnung der neuen Sterole in die Ergosterol-Biosynthese ist in Abbildung 34 und Abbildung 36 dargestellt.

Dieser postulierte Syntheseweg zeigt auch, dass Lanosterol durch einen Nebenweg in das C14-methylierte-Sterol konvertiert wird. Das für die Inhibition der Lanosterol-Demethylase typische Marker-Sterol 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol ist laut Untersuchungen von Martel et al. potentiell toxisch. Eine Anreicherung von 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol-Strukturen in der Zelle kann das Zellwachstum beeinträchtigen (Martel et al., 2010). Interessant ist hierbei auch, dass bei Pilzen ein Defekt der Sterol-C5-Desaturase (Erg3) zu einer Azol-Resistenz führt. (Lupetti et al., 2002; Kelly et al., 1995; Kelly et al., 1997). Nur das potentiell fungistatische 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol kommt in den resistenten Stämmen nicht vor.

Diese potentiell toxische Wirkung dieses 14-Methyl-Diols ist ein häufig und kontrovers diskutiertes Phänomen (Bard et al., 1993; Kelly et al. 1995; Akins, 2005). Der Theorie, dass dieses Diol toxisch wirkt, widersprechen jedoch die Steroldaten der Diplomarbeit von Engelhardt (Engelhardt, 2012). Hier wurden auf gleiche Weise wie in der hier vorliegenden Arbeit Sterolanalysen durchgeführt. Mehrere Isolate, wie beispielsweise Can739 (aus S. Rupps Labor), zeigten eine stark ausgeprägte Resistenz gegenüber Fluconazol und EMC120B12. Bereits in unbehandelten Proben konnte jedoch das 14-Methyldiol in großer Menge nachgewiesen werden (ca. 60 % der gemessenen Sterole). Diese Ergebnisse könnten gegen die Toxizität des Marker-Sterols sprechen. Möglich ist jedoch, dass sich die toxische Wirkung erst in noch größeren Mengen des Sterols auswirkt. Zudem könnten manche Stämme, wie Can739, das 14-Methyldiol möglicherweise generell besser tolerieren, ausschleusen oder umbauen als dies andere *Candida*-Stämme vermögen.

#### **4.3.6 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR zur Verifizierung des Targets**

Zur Verifizierung des Targets der untersuchten Substanzen und zur weiteren Charakterisierung der Resistenzmechanismen wurden Expressionsprofile einzelner



Gene von *C. albicans* mittels quantitativer Real time-PCR (qRT-PCR) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den entsprechenden Sterolmustern verglichen.

Für *Candida* spp. sind sowohl an der Ergosterol-Biosynthese beteiligte Gene, als auch Gene, die für Effluxpumpen codieren, sowie zwei Transkriptionsfaktoren, die an Resistenzen beteiligt sein sollen, untersucht worden. Wirkstoff-Resistenzen werden häufig mit einer Hochregulation der Gene assoziiert, die für Efflux-Pumpen codieren. Erhöhte mRNA-Level der „*Candida drug resistance*“-Genfamilie (*CDR*), die Teil der ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter-Superfamilie sind, und der MFS (*Major faciliator superfamily*)-Transporter Mdr1p werden mit Azol-Resistenzen in Verbindung gebracht (Marr et al., 1998; Lyons und White, 2000). Auch eine Hochregulation aller *ERG*-Gene wird in der Regel als Reaktion auf Azol-Behandlung beobachtet. Besonders *ERG11*, *ERG3* und *ERG6* werden dabei signifikant hochreguliert (De Backer et al.; 2001). *ERG3* und *ERG6* sind zudem entscheidend an der Katalyse verschiedener Reaktionen zur weiteren Umwandlung akkumulierender Sterole nach einer Azol-Behandlung beteiligt. Die Hochregulation von *ERG11* gilt gemeinhin als Resistenzmechanismus, um der vollständigen Inhibierung der Lanosterol-Demethylase durch Azole entgegenzuwirken (Lupetti et al., 2002). Darüber hinaus wurde auch der Transkriptionsfaktors *UPC2* untersucht. *UPC2* reguliert die Transkription der *ERG*-Gene und die des Transkriptionsfaktors *MRR1*, der für den *Major faciliator MDR1* zuständig ist.

In dieser Arbeit liegen bislang noch keine Daten von biologischen Replikaten, aber einige technische Replikate vor. Die Daten der qRT-PCR-Messung des *C. albicans* Wildtyps Can14 zeigen sehr unterschiedliche Genexpressionsprofile für die Expression nach einer Fluconazol-Behandlung im Vergleich zu EMC120B12-behandelten Proben (Abbildung 37).

Nach der Azol-Behandlung sind sowohl in hoher als auch in niedriger Konzentration nur *ERG3* und *ERG6* hochreguliert. Die Behandlung mit EMC120B12 hingegen verursacht eine erhöhte Expression aller untersuchten Gene. Proben, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an EMC120B12 behandelt wurden, zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede.

Bei 0,125 µg/ml ( $IC_{50}$ ) werden alle *ERG*-Gene, insbesondere *ERG6*, *ERG3* und *ERG11*, und der korrespondierende Transkriptionsfaktors *UPC2* hochreguliert. Nach einer Behandlung mit 2 µg/ml EMC120B12 kann eine verstärkte Expression der *CDR*-

Efflux-Gene gemessen werden. *CDR2* wurde dabei sogar um mehr als das Hundertfache hochreguliert. Die Hochregulation von *ERG3* und *ERG6* könnte im Zusammenhang mit der Inhibition der C14-Demethylase stehen. Aus dieser Inhibition resultiert die Bildung und Akkumulation von Eburicol und des Inhibitionsmarkers 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Erg6p katalysiert die Reaktion von Lanosterol zu Eburicol und Erg3p die Reaktion von 14-Methylfecosterol zu 14-Methylergosta-8,24(28)-dienol (Martel et al., 2010; Martel und Parker et al., 2010; Shimokawa et al., 1989).

EMC120B12 induziert scheinbar in *C. albicans* Can14 typische Resistenzmechanismen. So konnte eine erhöhte Expression von Erg11 und der Efflux-Pumpen, speziell *CDR2*, nach Behandlung mit der Substanz gemessen werden. Die Ergebnisse geben erste Hinweise auf die Expression der verwendeten Gene in *C. albicans* nach Behandlung mit den Substanzen. Genaue Aussagen können jedoch erst getroffen werden, wenn mehrere biologische Replikate untersucht wurden.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse dieser Arbeit lassen aber bereits vermuten, dass sich die Wirkung von EMC120B12 auch auf Genebene in gewisser Weise von der Wirkung von Fluconazol unterscheidet. Der Unterschied ist hierbei aber nicht genau erkennbar. Er könnte aber an der Bindungsaffinität sowohl am Target wie auch an den Efflux-Pumpen liegen.

Dennoch liegt auch bei den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen die Vermutung nahe, dass EMC120B12 effektiver als Fluconazol wirkt und folglich auch eine allgemein stärkere Expression der hier analysierten Gene hervorruft.

#### **4.4 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der AS-HTS-Assay einmalig unter allen bekannten Wirkstoff-Screenings ist und im Vergleich mit den gängigen Standardmethoden, wie der EUCAST-Methode, bestehen kann. Sein großer Vorteil ist, dass die Vitalität der Humanzellen als Maßstab der Auswertung herangezogen wird. Dies spart Zeit und Kosten beim Screening nach potentiellen Wirkstoffen. Durch seine Genauigkeit stellt der Assay eine gute Alternative zu konventionellen Methoden dar und ist nach der in dieser Arbeit erfolgten Adaption an weitere hyphenbildende *Candida*-Spezies wie *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* vielseitig einsetzbar. Die im Screening in mehreren Batches getestete Substanz EMC120B12 ist mit einem SI-Wert

von 63 ein guter Kandidat für eine Weiterentwicklung zu einem Wirkstoff. Das (S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazol ist einzigartig und die chiralen Alkylamin-Reste des Benzimidazol-Rings scheinen für die Aktivität der Substanz entscheidend zu sein. Es ist bekannt, dass nur das (S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazol und nicht das (R)-Enantiomer der Verbindung eine antimykotische Aktivität im AS-HTS-Assay zeigt (Bauer et al., 2010). Zudem zeigt EMC120B12 auf Monolayern als auch in komplexen 3D-Hautmodellen eine hervorragende Verträglichkeit auf die Wirtszellen. Die Untersuchungen im Epithelmodell bestätigen zudem die Gewebegängigkeit und die Bioverfügbarkeit der Substanz, aber auch die Effektivität und den antimykotischen Effekt von EMC120B12 nach Infektion mit verschiedenen *Candida*-Spezies. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass EMC120B12 gegen die meisten humanpathogenen Hefen wirkt und eine ähnliche antimykotische Aktivität besitzt, wie das seit langem in der Therapie von Pilzinfektionen eingesetzte Fluconazol. Interessant ist dabei, dass viele Fluconazol-resistente Stämme, wie auch *C. krusei* mit seiner intrinsischen Resistenz gegen Azole, eine Sensitivität gegen EMC120B12 zeigen. Die neue Substanz hat hier eine stärkere antimykotische Wirkung als das Azol. Auch der ermittelte MHK-Wert für *C. krusei* ist signifikant niedriger als der für Fluconazol. Auf Transkriptebene konnte ebenso eine große Ähnlichkeit zwischen den Daten des Azols Fluconazol und den Daten nach einer Behandlung mit dem Benzimidazol EMC120B12 gefunden werden. Die induzierten Gene waren in großer Zahl deckungsgleich mit denen aus den Transkriptdaten von EMC120B12. Hiermit konnte das erste Mal im direkten Vergleich bestätigt werden, dass Fluconazol und EMC120B12 im gleichen Biosyntheseweg interagieren und, dass EMC120B12 auch ein Inhibitor der Ergosterol-Biosynthese ist. Durch Immunofluoreszenz-Aufnahmen des Tubulins in den Hefezellen kann diese Ähnlichkeit zu Fluconazol und gleichzeitig der Unterschied zu anderen Benzimidazolen ebenso eindeutig gezeigt werden. Die Sterolanalysen verschiedener *Candida*-Stämme bestätigen ebenfalls dieses Ergebnis. Zudem beweisen die Analysen, dass EMC120B12 und Fluconazol die Sterolmuster der pathogenen Hefen auf gleiche Weise verändern. Es akkumulieren die gleichen Sterole bei beiden Wirkstoffen. EMC120B12 greift die Lanosterol-Demethylase (Erg11p) an und inhibiert somit dasselbe Enzym wie Fluconazol in der Ergosterol-Biosynthese. Der einzige Unterschied zwischen den Ergebnissen zu EMC120B12 und Fluconazol besteht darin, dass die Pilzzellen nur mit einer halb so hohen Konzentration an EMC120B12

behandelt werden müssen, um einen ähnlich starken Hemmeffekt wie nach einer Fluconazol-Behandlung zu bewirken. Dies differenziert EMC120B12 von den Azolen und weist darauf hin, dass bestimmte *Candida* spp. möglicherweise etwas anders oder sensitiver auf EMC120B12 als auf Fluconazol reagieren oder die Bindung der Substanz an das Zielenzym stärker ist, als bei den Azolen. Zudem konnten in dieser Arbeit drei neue Sterole in *C. albicans* und *C. krusei* detektiert werden. Zwei der Sterole, Sterol 6 und Sterol 7, wurden nur bei *C. krusei* entdeckt. Dies könnte auf die verbesserte Effizienz von EMC120B12 in moderaten Konzentrationen zurückzuführen sein, denn die neuen Sterole sind bei *C. krusei* auch nach einer Fluconazol-Behandlung mit sehr hohen Konzentrationen zu finden. *C. krusei* zeigt nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 256 µg/ml Fluconazol ein vergleichbares Sterolmuster wie nach einer Behandlung mit 1 µg/ml EMC120B12. Dies ermöglicht es, den Ergosterol-Biosyntheseweg nach einer Inkubation mit EMC120B12 aufzuzeigen und den Syntheseweg mit allen entstehenden Zwischenprodukten darzustellen. Darüber hinaus können die neu identifizierten Sterole als Derivate des Marker-Sterols 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol in die Ergosterol-Biosynthese eingeordnet werden. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse dieser Arbeit lassen vermuten, dass sich die Wirkung von EMC120B12 auch auf Genebene von Fluconazol zum einen sehr ähnelt, aber in gewisser Weise unterscheidet. Der genaue Unterschied ist hierbei aber nicht erkennbar. Dennoch liegt auch bei den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen die Vermutung nahe, dass EMC120B12 effektiver als Fluconazol wirkt und folglich auch eine allgemein stärkere Expression der hier analysierten Gene hervorruft. Der Unterschied könnte an der Bindungsaffinität sowohl am Target Erg11p als auch an den Efflux-Pumpen liegen. Hierbei beeinflusst eventuell die Molekülgröße die Bindung und die Bindungsstärke.

#### **4.5 Ausblick**

EMC120B12 ist eine vielversprechende, neue antimykotische Substanz, die eine gute Wirkung gegen humanpathogene Hefen zeigt. Das Benzimidazol hat durch das Screening und die Titration im AS-HTS-Assays, sowie durch 3D-Hautmodelle, erste Toxizität-Tests durchlaufen. Dies ist für die meisten potentiellen Hit-Komponenten in der Literatur nicht der Fall. In allen bisherigen Analysen zeigt die einzigartige Substanz sehr gute Ergebnisse und wirkt auf viele *Candida*-Stämme sogar stärker als Fluconazol. Wieso sich die Wirkung zwischen beiden Substanzen etwas

unterscheidet, kann in nächsten Schritten eventuell geklärt werden. Hierfür würde sich eine Überprüfung der Inhibition der katalytischen Funktion des Enzyms C14-Demethylase (Erg11p) auf Proteinebene anbieten. Dazu sollte das Enzym Erg11p aktiv aus der Plasmamembran isoliert und nach Zugabe des Inhibitors EMC120B12 der Umsatz des enzymspezifischen Substrats Lanosterol im Vergleich zu Fluconazol und zu einer unbehandelten Kontrolle überprüft werden. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass nicht das fehlende Ergosterol nach einer Inhibition von Erg11p, sondern die Bildung des toxischen Nebenproduktes, allein oder in Kombination mit zu wenig Ergosterol, die wachstumshemmende Wirkung verursacht. Dies sollte durch nachfolgende Untersuchungen ebenfalls weiter verfolgt werden. Zur weiteren Charakterisierung des molekularen Ziels sind weitere Replikate der Genexpressionsanalyse von *C. albicans* nach Behandlung mit EMC120B12 und Fluconazol sinnvoll. Zudem wäre es hilfreich die Genomsequenz von *C. krusei* zu sequenzieren, um auch für diesen Pilz Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real Time-PCR durchführen zu können und die Homologie der Erg-Gene zu vergleichen.

Der nächste Schritt im Rahmen der Arzneimittelentwicklung ist nun EMC120B12 in Tiermodellen einzusetzen und auf eventuelle Nebenwirkungen und Metabolisierung im komplexen Organismus zu überprüfen. Im Nematodenmodell konnte der antimykotische Effekt von EMC120B12 bereits eindeutig gezeigt werden (Daten nicht publiziert). Weiterführend wäre nun eine Testreihe mit EMC120B12 im Mausmodell erforderlich. Dadurch könnten weitere Daten über das Benzimidazol in einem komplexen Organismus erhalten werden. Diese Daten sind wichtig, um die Substanz für die klinische Forschung interessant zu machen und ein neues, effektives und hoffentlich auch im Körper gut verträgliches Medikament zu entwickeln.

Vorab sollten zudem weitere pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt werden, um Informationen über die Resorption der Substanz und die Distribution im Körper und der biologischen Metabolisierung zu gewinnen.

Durch die besonders guten Ergebnisse in dieser Arbeit und durch die Informationen aus dem Nematodenmodell der Universitätsklinikum Tübingen ist EMC120B12 auf einem guten Weg ein neuer antimykotischer Wirkstoff zu werden. Es könnte als Einzelwirkstoff oder in Kombination mit anderen Antimykotika Einsatz finden. Interessant wären auch Tests mit Hefepilzen der Gattung *Malassezia* durchzuführen.

Diese Pilze sind oft an der Ursache von Schuppenbildung beteiligt. Bei einer Wirkung von EMC120B12 auch auf diese Hefe, könnte ein weiterer Weg der Substanz auch der Einsatz in Kosmetikprodukten und Schuppenshampoos sein. Zusammengefasst hat das Benzimidazol EMC120B12 ein sehr großes Potential in seiner Weiterentwicklung und ist vor allem die ideale Ausgangssubstanz um zu einem neuen, in der Klinik relevanten, Wirkstoff entwickelt zu werden, der auch bei Infektionen mit Azol-resistenten humanpathogenen Pilzen Einsatz finden könnte.

## Literaturverzeichnis

- Abbas J, Bodey GP, et al. (2000) *Candida krusei* Fungemia An Escalating Serious Infection in Immunocompromised Patients. *Arch Intern Med.*, 2000;160(17):2659-2664.
- Akins RA (2005) *An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in Candida albicans*. *Medical Mycology*, June 2005, 43, 285/318
- Anaïssie E, Hachem R, et al. (1993) *Experimental hematogenous candidiasis caused by Candida krusei and Candida albicans: species differences in pathogenicity*. *Infect Immun*, 1993 Apr;61(4):1268-71.
- Angiolella L, Micocci MM et al. (2002) *Identification of major glucan-associated cell wall proteins of Candida albicans and their role in fluconazole resistance*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46:1688-1694.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, et al. (2012) *EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCASTAFST)\**. *Clin Microbiol Infect*, 18(7): E246-E247.
- Bard M, Lees ND, et al. (1993) *Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans*. *Lipids*, 28(11): 963-967.
- Bauer, J, Kinast S, et al. (2011) *High-throughput-screening-based identification and structure-activity relationship characterization defined (S)-2-(1-aminoisobutyl)-1-(3-chlorobenzyl)benzimidazole as a highly antimycotic agent nontoxic to cell lines*. *J Med Chem*, 54(19): 6993-6997.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) *Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing*. *J. R. Stat. Soc. B*, 57:289-300.
- Berman J, Sudbery PE (2002) *Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast*. *Nat Rev Genet*, 3: 918-30
- Bracher F (2003) *Angriffspunkt Ergosterol-Biosynthese. Wirkstoffe und Wirkprinzipien [Attack point of ergosterol biosynthesis. Drugs and pharmacology]*. *Pharm Unserer Zeit*, 32(2): 118-123.
- Brunke S, Hube B (2013) *Two unlike cousins: Candida albicans and C. glabrata infection strategies*. *Cellular Microbiology*, 15(5), 701–708
- Burger-Kentischer A., Finkelmeier D, et al. (2011) *A screening assay based on hostpathogen interaction models identifies a set of novel antifungal benzimidazole derivatives*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 55(10): 4789-4801.
- Calderone RA (2002) *Candida and Candidiasis*. ASM Press: 451.
- Calderone RA, Fonzi WA (2001) *Virulence factors of Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(7): 327-335.
- Dalle F, Wächtler B et al. (2010) *Cellular interactions of Candida albicans with human oral epithelial cells and enterocytes*. *Cell Microbiol.*, 2010 Feb;12(2):248-71.
- Davidse LC (1986) *Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24:43–65.
- De Backer MD, Ilyina T, et al. (2001) *Genomic profiling of the response of Candida albicans to itraconazole treatment using a DNA microarray*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45(6): 1660-1670.
- de Pauw BE, Meunier F (1999) *The Challenge of Invasive Fungal Infection*. *Chemotherapy*, 1999;45(suppl 1):1–14
- Dieterich C, Schandar M, et al. (2002) *In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of Candida albicans EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion*. *Microbiology*, 148:497–506.

- Elnima EI, Zubair MU, et al. (1981) *Antibacterial and antifungal activities of benzimidazole and benzoxazole derivatives*. Antimicrob. Agents Chemother., 19:29–32.
- Engelhardt I (2012) *Charakterisierung des Wirkmechanismus einer neuen antimykotischen Substanz in humanpathogenen Hefen*. Diplomarbeit Technische Universität Darmstadt Fachgebiet Biochemie, Fachbereich Chemie und Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
- EUCAST (2008) *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts*. Clin. Microbiol. Infect., 14:398–405.
- Fan J, Urban M, et al. (2013) *Characterization of the sterol 14 $\alpha$ -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function*. The New phytologist, 198:821-835.
- Fidel PL Jr., Vazquez JA et al. (1999) *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev., 1999 Jan; 12(1): 80–96.
- Fisher MA, Shen SH, et al. (1989) *Comparison of In Vivo Activity of Fluconazole with That of Amphotericin B against Candida tropicalis, Candida glabrata, and Candida krusei* Antimicrob Agents Chemother., Sept. 1989, p. 1443-1446 Vol. 33, No. 9
- Ghannoum MA, Rice LB (1999) *Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance*. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 1999, p. 501–517 Vol. 12, No. 4
- Giera M, Plossl F, et al. (2007) *Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway*. Steroids, 72:633-642.
- Gow NA, Brown AJ et al. (2002) *Fungal morphogenesis and host invasion*. Curr Opin Microbiol, 5, 366-71.
- Guthrie BA, Wickner W (1988) *Yeast vacuoles fragment when microtubules are disrupted*. J Cell Biol., 1988 Jul;107(1):115-20.
- Hibbett DS, Binder M, et al. (2007) *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. Mycol Res., 2007 May;111(Pt 5):509-47.
- Hof H (2003) *Candida, Aspergillus und Co. Pathogene Pilze [Candida, aspergillus and company. Pathogenic fungi]* Pharm. Unserer Zeit, 32. Nr. 2
- Hollomon DW, Butters JA, et al. (1998) *Fungal beta-tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides*. Antimicrob Agents Chemother., 1998 Sep; 42(9): 2171-3.
- Hube B (2004) *From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of Candida albicans*. Curr Opin Microbiol, 7, 336-41.
- Hull CM, Raisner RM, et al. (2000) *Evidence for mating of the "asexual" yeast Candida albicans in a mammalian host*. Science, 289, 307-10.
- Jacobs CW, Adams AEM, et al. (1988) *Functions of Microtubules in the Saccharomyces cerevisiae Cell Cycle*. The Journal of Cell Biology, Volume 107.
- Kanafani ZA, Perfect JR (2008) *Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact*. Clinical Infectious Diseases 2008; 46:120–8
- Kauffman C A (2006) *Fungal infections*. Proc Am Thorac Soc, 3(1): 35-40.
- Keller P, Müller C, et al. (2015) *An Antifungal Benzimidazole Derivative Inhibits Ergosterol Biosynthesis and Reveals Novel Sterols*. Antimicrob Agents Chemother., 2015 Oct;59(10):6296-307.



- Kelly SL, Lamb DC, et al. (1997). *Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in Candida albicans from AIDS patients caused by defective sterol Delta(5,6)-desaturation*. Febs Lett, 400:80-82.
- Kelly SL, Lamb DC, et al. (1995) *Mode of Action and Resistance to Azole Antifungals Associated with the Formation of 14-Alpha-Methylergosta-8,24(28)-Dien-3-Beta,6-Alpha-Diol*. Biochem Biophys Res Commun, 207(3): 910-915.
- Kilmartin JV, Adams AEM (1984) *Structural Rearrangements of Tubulin and Actin during the Cell-Cycle of the Yeast Saccharomyces*. J Cell Biol, 98:922-933.
- Kilmartin JV, WRIGHT B, et al, (1982) *Rat Monoclonal Antitubulin Antibodies Derived by Using a New Nonsecreting Rat Cell Line*. The Journal of Cell Biology, Volume 93, June 1982: 576-582
- Kleymann G., Werling HO (2004) *A generally applicable, highthroughput screening-compatible assay to identify, evaluate, and optimize antimicrobial agents for drug therapy*. J. Biomol. Screen., 9: 578–587.
- Kunkel W (1980) *Effects of the antimicrotubular cancerostatic drug nocodazole on the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie, 20: 315-324.
- Li J, Katiyar SK, et al. (1996) *Site-directed mutagenesis of Saccharomyces cerevisiae beta-tubulin: Interaction between residue 167 and benzimidazole compounds*. Febs Lett, 385: 7-10.
- Liang H (2008) *Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 4, No. 31.
- Lo HJ, Kohler JR, et al. (1997) *Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent*. Cell, 90, 939-49.
- Loeffler J, Stevens DA (2003) *Antifungal drug resistance*. Clin Infect Dis, 36(Suppl1): S31-41.
- Lupetti A, Danesi R., et al. (2002) *Molecular basis of resistance to azole antifungals*. Trends Mol Med, 8(2): 76-81.
- Lyons CN, White TC (2000) *Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 44(9): 2296-2303.
- Magee BB, Legrand M, et al. (2002) *Many of the genes required for mating in Saccharomyces cerevisiae are also required for mating in Candida albicans*. Mol Microbiol, 46, 1345-51.
- Magee, BB, Magee PT (2000) *Induction of mating in Candida albicans by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains*. Science, 289, 310-3.
- March RE (1997) *An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 32: 351-369.
- Marichal P, Gorrens J, et al. (1995) *Origin of differences in susceptibility of Candida krusei to azole antifungal agents*. Mycoses, Volume 38, Issue 3-4, pages 111–117.
- Marr KA, Lyons CN, et al. (1998) *Rapid, transient fluconazole resistance in Candida albicans is associated with increased mRNA levels of CDR*. Antimicrob Agents Chemother, 42(10): 2584-2589.
- Martel CM and Parker JE, et al. (2010) *Identification and characterization of four azoleresistant erg3 mutants of Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, 54(11): 4527-4533.
- Martel CM, Parker JE, et al. (2010) *A clinical isolate of Candida albicans with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 $\alpha$ -demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B*. Antimicrob Agents Chemother, 54(9): 3578-3583.

- Mavor AL, Thewes S, et al. (2005) *Systemic fungal infections caused by Candida species: epidemiology, infection process and virulence attributes*. *Curr Drug Targets* 6(8): 863-874.
- Messer SA, Diekema DJ, et al. (2006) *Activities of Micafungin against 315 Invasive Clinical Isolates of Fluconazole-Resistant Candida spp.* *Journal of clinical Microbiology*, p. 324–326 Vol. 44, No. 2
- Morschhäuser J (2002) *The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587 (2002) 240– 248
- Morschhäuser J. (2003) *Wie „entkommen“ Pilze der Therapie? Resistenzen und Resistenzmechanismen [How do fungal infections "escape" treatment? Resistance and resistance mechanisms]*. *Pharm Unserer Zeit*, 32(2): 124-128.
- Müller C, Staudacher V, et al. (2013). *A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total ergosterol biosynthesis*. *Steroids*, 78:483-493.
- Nakanishi S, Nishino T, et al. (1987). *Characterization of nystatin-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae and preparation of sterol intermediates using the mutants*. *Journal of biochemistry* 101:535-544.
- Nes WD (2011) *Biosynthesis of cholesterol and other sterols*. *Chem Rev*, 111(10): 6423-6451.
- Odds FC (1988) *Candida and Candidiasis*. London: Bailliere Tindall.
- Odds FC (1993) *Effects of Temperature on Anti-Candida Activities of Antifungal Antibiotics*. *Antimicrob Agents Chemother*, p. 685-691 Vol. 37, No. 4
- Odds FC (2010) *Resistance to antifungal agents*. *Fungal Genet Biol*, 47:190-190.
- Odds FC, Bernaerts R (1994) *CHROMagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important Candida Species*. *J Clin Microbiol.*, p. 1923-1929 Vol. 32, No. 8
- Odds FC, Brown AJ, et al. (2003) *Antifungal agents: mechanisms of action*. *Trends Microbiol*, 11(6): 272-279.
- Onyewu C, Blankenship JR, et al. (2003) *Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against Candida albicans, Candida glabrata, and Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(3): 956-964.
- Orozco AS, Higginbotham LM, et al. (1998) *Mechanism of fluconazole resistance in Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(10): 2645-2649.
- Parker JE, Merkamm M, et al., (2008) *Differential azole antifungal efficacies contrasted using a Saccharomyces cerevisiae strain humanized for sterol 14 alpha-demethylase at the homologous locus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2008 Oct;52(10):3597-603.
- Pfaller MA, Diekema DJ (2007) *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:133–163.
- Pfaller MA, Diekema DJ, et al. (2001) *International Surveillance of Bloodstream Infections Due to Candida Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. *J Clin Microbiol*, p. 3254–3259 Vol. 39, No. 9.
- Pfaller MA, Diekema DJ, et al. (2008) *Candida krusei, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005*. *J Clin Microbiol* p. 515–521 Vol. 46, No. 2.

- Pfaller MA, Messer SA, et al., (2011) *Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009)*. Int J Antimicrob Agents, Jul; 38 (1): 65-9.
- Phan QT, Myers CL, et al (2007) *Als3 Is a Candida albicans Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells*. PLoS Biology, Volume 5, Issue 3, e64.
- Pujol C, Reynes J, et al. (1993) *The yeast Candida albicans has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 9456-9.
- R (2009), posting date. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. RDevelopment Core Team. [Online.]
- Richardson MD, Donaldson F (1994) *Interaction of Candida krusei with human neutrophils in vitro*. J. Med. Microbiol. - Vol. 41 (1994), 384-388
- Ritchie ME, Silver J, et al. (2007) *A comparison of background correction methods for two-colour microarrays*. Bioinformatics, 23:2700-2707.
- Rupp S (2008) *Transcriptomics of the fungal pathogens focusing on Candida albicans human and animal relationships*, p. 187–222. In: A. Brakhage and P. Zipfel (ed.), The mycota, 2nd ed., vol. 7. Human and animal relationships. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP (1994) *Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen*. J. Med. Microbiol. - Vol. 41 (1994), 295-310.
- Sanati H, Belanger P, et al., (1997) *A New Triazole, Voriconazole (UK-109,496), Blocks Sterol Biosynthesis in Candida albicans and Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother, p. 2492–2496 Vol. 41, No. 11
- Sanglard D (2002) *Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs*. Curr Opin Microbiol, 5(4): 379-85.
- Sanglard D, Ischer F, et al (1996) *Susceptibilities of Candida albicans multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother. 40(10):2300-5.
- Sanglard D, Ischer F, et al (1998) *Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates*. Drug Resistance Updates, 1998;1(4):255-65.
- Sanglard D, Odds FC (2002) *Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences*. Lancet Infect Dis, 2(2): 73-85.
- Sharma D, Narasimhan B, et al. (2009) *Synthesis, antimicrobial and antiviral activity of substituted benzimidazoles*. J Enzyme Inhib Med Chem. 2009 Oct;24(5):1161-8.
- Shimokawa O, Kato Y, et al. (1989) *Accumulation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol in 14 alpha-demethylation mutants of Candida albicans: genetic evidence for the involvement of 5-desaturase*. Biochimica et biophysica acta, 1003:15-19.
- Smyth GK (2004) *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 3:Article3.
- Smyth GK (2005) *Limma: Linear models for microarray data*. p. 397-420. In: Gentleman R, Carrey, V., Dudoit, S., Irizzary, I., Huber, W. (ed.),

- Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. Springer, New York.
- Smyth GK, Michaud J, et al. (2005) *Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments*. *Bioinformatics*, 21:2067-2075.
- Sohn K, Senyurek I, et al. (2006) *An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of Candida albicans to different human epithelia*. *FEMS yeast research*, 6:1085-1093.
- Staudacher V (2012) *Entwicklung eines Testsystems zur Charakterisierung von Enzym-Inhibitoren des Post-Lanosterol-Abschnitts der Ergosterol-Biosynthese mittels GC/MS*. Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Tietz HJ (2011) *Antimykotika von A-Z, Therapie der Mykosen von Ambulanz bis zur Intensivmedizin*. Ligatur-Verlag; Auflage: 5, 2011, ISBN: 978-3940407320
- Tortorano AM, Kibbler C, et al. (2006) *Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance*. *Int J Antimicrob Agent*, 27:359-366.
- Vanden Bossche H, Warnock DW, et al. (1994) *Mechanisms and Clinical Impact of Antifungal Drug-Resistance*. *J Med Vet Mycol*, 32:189-202.
- Wächtler B, Citiulo F, et al. (2012) *Candida albicans-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process*. *PLoS ONE*, Volume 7, Issue 5, e36952.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Wachstumsformen von <i>C. albicans</i> und <i>C. krusei</i> .....	26
Abbildung 2: Verschiedene Substanzklassen der Antimykotika mit deren Angriffspunkten in der Pilzzelle, modifiziert nach Odds et al., 2003.....	28
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Ergosterol-Biosynthese unter Angabe der wichtigsten Zwischenprodukte .....	31
Abbildung 4: Mögliche Resistenzmechanismen gegen Azole in Hefen .....	37
Abbildung 5: Schematische Darstellung des AS-HTS-Assays.....	42
Abbildung 6: EMC120B12 im Vergleich mit anderen Antimykotika.....	44
Abbildung 7: Aufbau eines <i>in vitro</i> 3D-Hautmodells.....	59
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Screening-Platte des AS-HTS-Assays .....	64
Abbildung 9: Ergebnis einer Wirkstoffplatte des AS-HTS-Screenings .....	87
Abbildung 10: Titration von Substanzen mit dem AS-HTS-Assay .....	89
Abbildung 11: Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Werts mit dem AS-HTS-Assay für <i>C. albicans</i> .....	90
Abbildung 12: Erweiterung des AS-HTS-Assays auf <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> und <i>C. dubliniensis</i> .....	91
Abbildung 13: Bestimmung der optimalen Zellzahl nach Erweiterung des AS-HTS-Assays auf weitere <i>Candida</i> -Spezies .....	93
Abbildung 14: Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes mit dem AS-HTS-Assay für <i>C. dubliniensis</i> CBS.....	94
Abbildung 15: Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes mit dem AS-HTS-Assay für <i>C. tropicalis</i> .....	94
Abbildung 16: MHK-Verteilung von 150 <i>Candida</i> -Stämmen verschiedener Spezies .....	97
Abbildung 17: MHK-Verteilung für <i>C. krusei</i> .....	97
Abbildung 18: Gescannte 96-Well-Platte zur Bestimmung von MHK-Werten nach EUCAST.....	99
Abbildung 19: Bestimmung der MHK-Werte für Fluconazol und EMC120B12 mittels EUCAST.....	100
Abbildung 20: Effekt von EMC120B12 in einem <i>in vitro</i> 3D-Epithelmodell (Darmepithelzelllinie Caco-2) nach Infektion mit <i>C. albicans</i> .....	102

Abbildung 21: Effekt von EMC120B12 in einem <i>in vitro</i> 3D-Epithelmodell (Darmepithelzelllinie Caco-2) nach Infektion mit <i>C. dubliniensis</i> .....	103
Abbildung 22: Effekt von EMC120B12 in einem <i>in vitro</i> 3D-Epithelmodell (Darmepithelzelllinie Caco-2) nach Infektion mit <i>C. tropicalis</i> .....	104
Abbildung 23: Mikroskopie von Gewebeschnitten P.A.S. gefärbter <i>in vitro</i> 3D-Epithelmodelle mit TR146 Zellen mit und ohne Infektion durch <i>C. glabrata</i> .....	105
Abbildung 24: Ergosterol-Biosynthese mit relevanten Zwischenprodukten und Enzymen .....	108
Abbildung 25: Zusammenfassung der Daten der Transkriptionsanalysen für alle verwendete Wirkstoffe .....	112
Abbildung 26: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von <i>C. albicans</i> Tubulin .....	113
Abbildung 27: Darstellung von GC/MS-Daten akkumulierender Sterole ohne weiterführender Aufarbeitung der Rohdaten durch Extraktion der Qualifier Ionen .....	117
Abbildung 28: Extraktion der Qualifier Ionen für eine verbesserte relative Quantifizierung der akkumulierenden Sterole am Beispiel von Eburicol .....	118
Abbildung 29: Sterolmuster von <i>C. albicans</i> und <i>C. krusei</i> nach Behandlung mit dem Benzimidazol-Derivat Nocodazol .....	120
Abbildung 30: Chromatogramme der extrahierten Ionen akkumulierender Sterole nach Behandlung von <i>C. albicans</i> Wildtyp Can14 und <i>C. albicans</i> Can741 mit Fluconazol und EMC120B12 .....	124
Abbildung 31: Chromatogramme der extrahierten Ionen akkumulierender Sterole nach Behandlung von <i>C. krusei</i> Wildtyp mit Fluconazol und EMC120B12 .....	128
Abbildung 32: Chromatogramm aller detektierten Sterolfractionen von <i>C. krusei</i> Wildtyp nach Behandlung mit 4 µg/ml EMC120B12 .....	128
Abbildung 33: Massenspektren aller detektierten Sterole von <i>C. krusei</i> nach Behandlung mit 4 µg/ml EMC120B12 .....	131
Abbildung 34: Einordnung der neu identifizierten Sterole in <i>C. krusei</i> in den Ergosterol-Biosyntheseweg nach Inkubation mit EMC120B12 > 4µg/ml .....	132

Abbildung 35: Vergleich der Sterolmuster von <i>C. krusei</i> nach Behandlung mit Fluconazol und EMC120B12 .....	134
Abbildung 36: Erweiterte Ergosterol-Biosynthese unter Inhibition des Enzyms Erg11p.....	137
Abbildung 37: Auswertung der Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR.....	139





## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Enzyme der Ergosterol-Biosynthese unter Angabe der kodierenden Gene.....	39
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	47
Tabelle 3: Verwendete Kits, Enzyme und Antikörper.....	49
Tabelle 4: Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	49
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software.....	50
Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien für zellbiologische Arbeiten .....	54
Tabelle 7: Chemikalien für zellbiologische Arbeiten .....	54
Tabelle 8: Verwendete humane Zelllinien.....	57
Tabelle 9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Histologie .....	58
Tabelle 10: Chemikalien für die Histologie.....	58
Tabelle 11: Für die GC/MS-Analyse verwendete Geräte und Software.....	75
Tabelle 12: Sterole unter Angabe ihrer Molekülmasse, Qualifier Ionen* und RRT.....	78
Tabelle 13: Auflistung verwendeter Primer-Sonden-Kombinationen der qRT-PCR.....	83
Tabelle 14: Vergleich der Genexpression von <i>C. albicans</i> SC5314 nach Behandlung mit EMC120B12, Fluconazol und Nocodazol .....	110
Tabelle 15: Übersicht der berechneten und detektierten RRTs der Sterole sortiert nach verschiedenen Grundstrukturen .....	129
Tabelle 16: Zusammenhang der relativen Retentionszeit und der Position der Doppelbindung im Sterol .....	130



## Anhang

### Anhang 1:

MHK-Werte für EMC120B12 und Fluconazol von 150 *Candida*-Stämmen und -Isolaten. Verändert nach Burger-Kentischer et al., 2011.

Nummer 10, 84 bis 96 und 109 bis 121: National Reference Center for Systemic Mycoses. Alle anderen: Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT), Universität Tübingen

### Anhang 2:

Aufgearbeitete Microarray-Daten für EMC120B12. Gezeigt sind alle im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant regulierten Gene nach 3 Stunden Inkubation mit EMC120B12. Signifikanz: cutoff bei  $\text{adj.P.Val} \leq 0,05$

### Anhang 3:

Übersicht unbearbeiteter Chromatogramme der GC/MS-Analysen für *C. albicans* WT Can14, für *C. albicans* Can741 und *C. krusei* WT. Die Peaks bestehen aus mehreren überlagerten Sterolen, da noch keine Extraktion der Qualifier Ionen stattgefunden hat.

### Anhang 4:

Rohdaten der qRT-PCR zur Analyse der Genexpressionsprofile von *C. albicans*. In der Tabelle sind folgende Daten geführt: Art der Behandlung (*Sample Name*), das zu analysierende Gen (*Target*), die Referenz (*Ref.*), der Mittelwert des CP (*Crossing Point*) des Zielgens (*Mean CP*), der Mittelwert des CP der Referenz (*Mean CP*), das Verhältnis der beiden Mittelwerte zueinander (*Target/Ref.*) und dessen Normalisierung (*Normalized*) angegeben. Letztere entspricht dem x-Fachen der mRNA des analysierten Gens im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollprobe.

## Anhang 1

Strain no.	Strain (n = 150)a	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		EMC120B12	Fluconazole
1	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	4	2
2	<i>C. albicans</i> DSMZ 11949	4	4
3	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	16	16
4	<i>C. guilliermondii</i> ATCC 90877	4	1
5	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.125	0.25
6	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0.125	0.125
7	<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 6258	0.25	0.5
8	<i>C. neoformans</i>	4	1
9	<i>C. albicans</i> 1008*	32	32
10	<i>C. albicans</i> 75	0.25	0.5
11	<i>C. albicans</i> 924*	128	128
12	<i>C. albicans</i> 931*	64	64
13	<i>C. albicans</i> 959*	128	128
14	<i>C. albicans</i> 971*	8	32
15	<i>C. albicans</i> 974*	8	4
16	<i>C. albicans</i> 987*	16	32
17	<i>C. albicans</i> 993*	16	16
18	<i>C. albicans</i> 994*	32	64
19	<i>C. albicans</i> 999*	64	32
20	<i>C. albicans</i> AM2001/0007	0.5	0.25
21	<i>C. albicans</i> AN 10481	8	0.25
22	<i>C. albicans</i> AN 10798	0.25	0.5
23	<i>C. albicans</i> AN 10883	0.125	0.125
24	<i>C. albicans</i> AN 11231	0.5	0.5
25	<i>C. albicans</i> AN 11549	0.5	0.25
26	<i>C. albicans</i> AN 13	0.125	0.125
27	<i>C. albicans</i> AN 13244	0.125	0.125
28	<i>C. albicans</i> AN 1699	8	32
29	<i>C. albicans</i> AN 1769	0.25	0.25
30	<i>C. albicans</i> AN 1994	128	16
31	<i>C. albicans</i> AN 2787	0.125	0.125
32	<i>C. albicans</i> AN 2829	4	64
33	<i>C. albicans</i> AN 3156	8	16
34	<i>C. albicans</i> AN 3431	0.125	0.125
35	<i>C. albicans</i> AN 3591	0.125	0.125
36	<i>C. albicans</i> AN 397	0.125	0.125
37	<i>C. albicans</i> AN 4071	4	16
38	<i>C. albicans</i> AN 4462.1	2	1
39	<i>C. albicans</i> AN 4835	0.125	0.25
40	<i>C. albicans</i> AN 562	1	16

41	<i>C. albicans</i> AN 5752.2	0.125	0.25
42	<i>C. albicans</i> AN 5944	0.25	0.25
43	<i>C. albicans</i> AN 5960	0.125	0.125
44	<i>C. albicans</i> AN 6160	0.25	0.25
45	<i>C. albicans</i> AN 62	0.125	0.125
46	<i>C. albicans</i> AN 6896	4	0.25
47	<i>C. albicans</i> AN 7961	0.125	0.125
48	<i>C. albicans</i> AN 8449	1	0.25
49	<i>C. albicans</i> AN 8775	0.25	0.25
50	<i>C. albicans</i> AN 9560	1	0.25
51	<i>C. albicans</i> AN 9645	0.25	0.25
52	<i>C. albicans</i> AN4051	2	0.5
53	<i>C. albicans</i> CA 20	0.125	0.125
54	<i>C. albicans</i> CA 21	0.125	0.125
55	<i>C. albicans</i> Jg 32570	128	16
56	<i>C. albicans</i> MY 2902/2008	0.5	16
57	<i>C. albicans</i> RU IV	1	1
58	<i>C. albicans</i> SCS 71865L	0.125	64
59	<i>C. albicans</i> VB 1723	4	0.5
60	<i>C. albicans</i> VB 1723	0.5	0.25
61	<i>C. albicans</i> VB 1811	0.125	0.125
62	<i>C. albicans</i> VB 21064	0.125	0.125
63	<i>C. albicans</i> VB 22905	0.25	0.125
64	<i>C. albicans</i> VB 2688	0.125	0.125
65	<i>C. albicans</i> VB 4384	2	0.5
66	<i>C. albicans</i> VB 4606	0.125	0.125
67	<i>C. albicans</i> VB 8567	0.125	0.125
68	<i>C. blankii</i> VB 13063	0.5	32
69	<i>C. glabrata</i> AN 10767	0.5	8
70	<i>C. glabrata</i> AN 12749	0.25	8
71	<i>C. glabrata</i> AN 12862	0.25	4
72	<i>C. glabrata</i> AN 1857	1	2
73	<i>C. glabrata</i> AN 4355	16	64
74	<i>C. glabrata</i> AN 4462.2	0.125	0.125
75	<i>C. glabrata</i> AN 5547	0.125	4
76	<i>C. glabrata</i> AN 8148	0.25	4
77	<i>C. glabrata</i> AN 8626	4	0.125
78	<i>C. glabrata</i> CG 7	4	2
79	<i>C. glabrata</i> VB 3346	4	64
80	<i>C. guilliermondii</i> AN 444	0.5	4
81	<i>C. guilliermondii</i> AN 6494	0.25	0.5
82	<i>C. guilliermondii</i> AN 8832	4	2
83	<i>C. guilliermondii</i> RU II	4	2
84	<i>C. krusei</i> 224	0.25	8
85	<i>C. krusei</i> 394	4	16
86	<i>C. krusei</i> 201	1	32
87	<i>C. krusei</i> 222	1	16

---

88	<i>C. krusei</i> 232	2	32
89	<i>C. krusei</i> 237	2	32
90	<i>C. krusei</i> 241	2	32
91	<i>C. krusei</i> 242	1	32
92	<i>C. krusei</i> 2572	2	32
93	<i>C. krusei</i> 337	2	32
94	<i>C. krusei</i> 364	1	32
95	<i>C. krusei</i> 39.986	2	32
96	<i>C. krusei</i> 639	1	32
97	<i>C. krusei</i> A 1934	2	32
98	<i>C. krusei</i> AN 12026	2	16
99	<i>C. krusei</i> AN 2572	1	16
100	<i>C. krusei</i> AN 2944	4	32
101	<i>C. krusei</i> AN 4557	2	32
102	<i>C. krusei</i> AN 8033	8	64
103	<i>C. krusei</i> AN 8829	4	32
104	<i>C. krusei</i> VB 18175	2	32
105	<i>C. lusitaniae</i> AN 5752.1	0.125	0.25
106	<i>C. lusitaniae</i> AN 6110.2	0.125	0.25
107	<i>C. lusitaniae</i> UR 14911	0.5	8
108	<i>C. nivariensis</i> RU IV	0.125	4
109	<i>C. parapsilosis</i> 352	2	16
110	<i>C. parapsilosis</i> 551	1	0.25
111	<i>C. parapsilosis</i> 553	0.5	0.25
112	<i>C. parapsilosis</i> 619 St-R	1	0.5
113	<i>C. parapsilosis</i> St-R 623	0.5	0.25
114	<i>C. parapsilosis</i> 1007.2	1	0.25
115	<i>C. parapsilosis</i> 10207	1	0.5
116	<i>C. parapsilosis</i> 10267	8	2
117	<i>C. parapsilosis</i> 4321	1	0.25
118	<i>C. parapsilosis</i> 549	2	1
119	<i>C. parapsilosis</i> 552	2	0.5
120	<i>C. parapsilosis</i> 554	2	0.25
121	<i>C. parapsilosis</i> 640	2	0.25
122	<i>C. parapsilosis</i> AN 1.5845	0.5	0.5
123	<i>C. parapsilosis</i> AN 1.6464	0.5	0.25
124	<i>C. parapsilosis</i> AN 11805	0.5	0.125
125	<i>C. parapsilosis</i> AN 3.7441	0.5	0.5
126	<i>C. parapsilosis</i> AN 3284	2	0.25
127	<i>C. parapsilosis</i> AN 3570	0.5	0.25
128	<i>C. parapsilosis</i> AN 39207	0.25	0.25
129	<i>C. parapsilosis</i> AN 5485	0.25	1
130	<i>C. parapsilosis</i> AN 6218	1	0.25
131	<i>C. parapsilosis</i> AN 6480	0.5	0.5
132	<i>C. parapsilosis</i> AN 7348	2	0.5
133	<i>C. parapsilosis</i> AN 7793	2	0.5
134	<i>C. parapsilosis</i> AN 7903	0.125	0.25

---

135	<i>C. parapsilosis</i> AV 7675	2	8
136	<i>C. parapsilosis</i> R V II	4	0.5
137	<i>C. parapsilosis</i> St-R 613	2	0.5
138	<i>C. parapsilosis</i> UR 13926	0.125	0.125
139	<i>C. parapsilosis</i> UR 2795V	0.5	0.25
140	<i>C. parapsilosis</i> UR 5428	0.5	0.25
141	<i>C. parapsilosis</i> VA 9625	1	0.25
142	<i>C. parapsilosis</i> VB 4188	1	0.5
143	<i>C. pelliculosa</i> AN 3525	16	8
144	<i>C. pelliculosa</i> AN 8197	16	16
145	<i>C. tropicalis</i> 550	0.5	0.25
146	<i>C. tropicalis</i> AN 1946	128	4
147	<i>C. tropicalis</i> AN 3241	0.25	0.5
148	<i>C. tropicalis</i> AN 4522.1	0.125	0.125
149	<i>C. tropicalis</i> AN 4572	2	1
150	<i>C. tropicalis</i> UR 15464	0.125	0.125

Zeile ...	Block	Row	Column	ID	Name	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
...1	4883	13	5	3	1353 C.albicans2V10001180	3,791145529	12,67166853	18,54696357	4,12E-12	2,53E-08	16,90826641
...2	5744	15	8	4	2277 C.albicans2V10001995	3,07179253	12,40447967	16,6110964	2,16E-11	1,32E-07	15,61382328
...3	662	2	14	2	3984 C.albicans2V10004376	2,295735752	11,29027039	15,88482393	4,20E-11	2,57E-07	15,07359632
...4	1470	4	14	10	4400 C.albicans2V10004322	1,371892178	10,82646937	11,89098544	2,86E-09	1,75E-05	11,43111082
...5	750	2	18	10	5512 C.albicans2V10005495	1,675746585	10,3221603	11,55247536	4,31E-09	2,64E-05	11,05990292
...6	1892	5	15	12	4899 C.albicans2V10004584	2,460740117	10,89934909	10,98513313	8,76E-09	5,36E-05	10,41177025
...7	2827	8	2	7	651 C.albicans2V10000488	2,22051928	13,2849217	10,12545018	2,715E-08	0,000166307	9,363540637
...8	4757	12	18	17	5470 C.albicans2V10005716	3,506086194	11,35411124	9,867577412	3,87E-08	0,000236824	9,032622762
...9	284	1	15	4	4532 C.albicans2V10004551	1,071027109	11,67219048	9,835593948	4,04E-08	0,00024752	8,991027746
...10	1288	4	5	8	1528 C.albicans2V10001393	-1,962717047	10,46261408	-9,50480354	6,43E-08	0,00039395	8,553532888
...11	5335	14	7	15	2149 C.albicans2V10002142	2,79637883	10,23132244	9,504279309	6,44E-08	0,000394179	8,552828868
...12	2291	6	15	11	4827 C.albicans2V10004772	1,606542361	11,68935327	8,99476008	1,35E-07	0,00082556	7,852119096
...13	610	2	11	10	3212 C.albicans2V10003223	0,87842848	10,73577022	8,82993789	1,72E-07	0,001055077	7,618264746
...14	2781	7	20	1	5831 C.albicansV10000083	2,119096468	10,16513792	8,593224624	2,47E-07	0,001509134	7,276091983
...15	6040	16	2	20	757 C.albicans2V10000534	2,132410757	8,028604472	8,504355743	2,83E-07	0,00172897	7,145679908
...16	5144	13	18	4	5669 C.albicans2V10005637	-1,760228734	9,798531889	-8,30810454	3,83E-07	0,002342957	6,853860204
...17	5973	15	19	13	5821 C.albicansV10000071	1,796683488	9,432462607	8,160527909	4,83E-07	0,002953524	6,630907039
...18	3298	9	5	18	1634 C.albicans2V10001813	1,639300898	10,89043882	8,15509576	4,87E-07	0,002978493	6,622642327
...19	1889	5	15	9	4611 C.albicans2V10004863	1,618464608	7,573013678	9,29482132	4,94E-07	0,003017813	6,651771179
...20	251	1	13	11	4044 C.albicans2V10004139	-1,568027424	12,70660624	-8,09013852	5,40E-07	0,003300249	6,523492547
...21	285	1	15	5	4248 C.albicans2V10004851	-1,397440347	10,16633694	-8,01640266	6,07E-07	0,003710958	6,410222931
...22	3090	8	15	10	4779 C.albicans2V10004771	1,402563624	9,386671628	7,934316801	6,93E-07	0,004232064	6,283220923
...23	2180	6	9	20	3011 C.albicans2V10002809	1,060695213	9,196018627	7,815984323	8,39E-07	0,005122751	6,098449479
...24	1305	4	6	5	1620 C.albicans2V10001666	-1,743543441	7,837249542	-7,69658453	1,02E-06	0,006222914	5,909976063
...25	5111	13	16	11	4821 C.albicans2V10004939	-1,030247267	12,51117068	-7,62448984	1,15E-06	0,00700438	5,795178085
...26	246	1	13	6	3944 C.albicans2V10003844	1,282200657	8,306151559	7,592244705	1,21E-06	0,007385908	5,743589708
...27	5497	14	15	17	4641 C.albicans2V10004792	2,06195322	8,928998648	7,515481601	1,37E-06	0,008386389	5,62016978
...28	680	2	14	20	4552 C.albicans2V10004353	0,979699152	11,03919182	7,333817356	1,86E-06	0,01136527	5,324662082
...29	534	2	7	14	2056 C.albicans2V10002152	1,300439007	11,71047663	7,209331251	2,30E-06	0,014031785	5,119366992
...30	3309	9	6	9	1550 C.albicans2V10001859	1,021272149	8,219556819	7,443522059	2,31E-06	0,014096163	5,15387368
...31	3264	9	4	4	1070 C.albicans2V10001101	1,549364168	9,715223442	7,01648858	3,20E-06	0,019528004	4,796825585
...32	4123	11	7	3	2162 C.albicans2V10001913	-0,932070972	10,54161043	-6,97478079	3,44E-06	0,020986977	4,726342516
...33	2013	6	1	13	39 C.albicans2V10000244	-2,391084126	9,981956455	-6,89201764	3,97E-06	0,024233601	4,585714945
...34	5267	14	4	7	1001 C.albicans2V10001016	-1,296712262	9,691435907	-7,09178512	4,07E-06	0,024821754	4,60305931
...35	326	1	17	6	5104 C.albicans2V10005018	1,007089609	10,58848956	6,798626051	4,68E-06	0,028531988	4,425807171
...36	2669	7	14	9	4279 C.albicans2V10004217	1,377203619	12,73865189	6,700431421	5,57E-06	0,033925729	4,256279162
...37	4603	12	11	3	3346 C.albicans2V10003277	-0,912044846	11,7174321	-6,49797648	7,99E-06	0,048691606	3,902238673



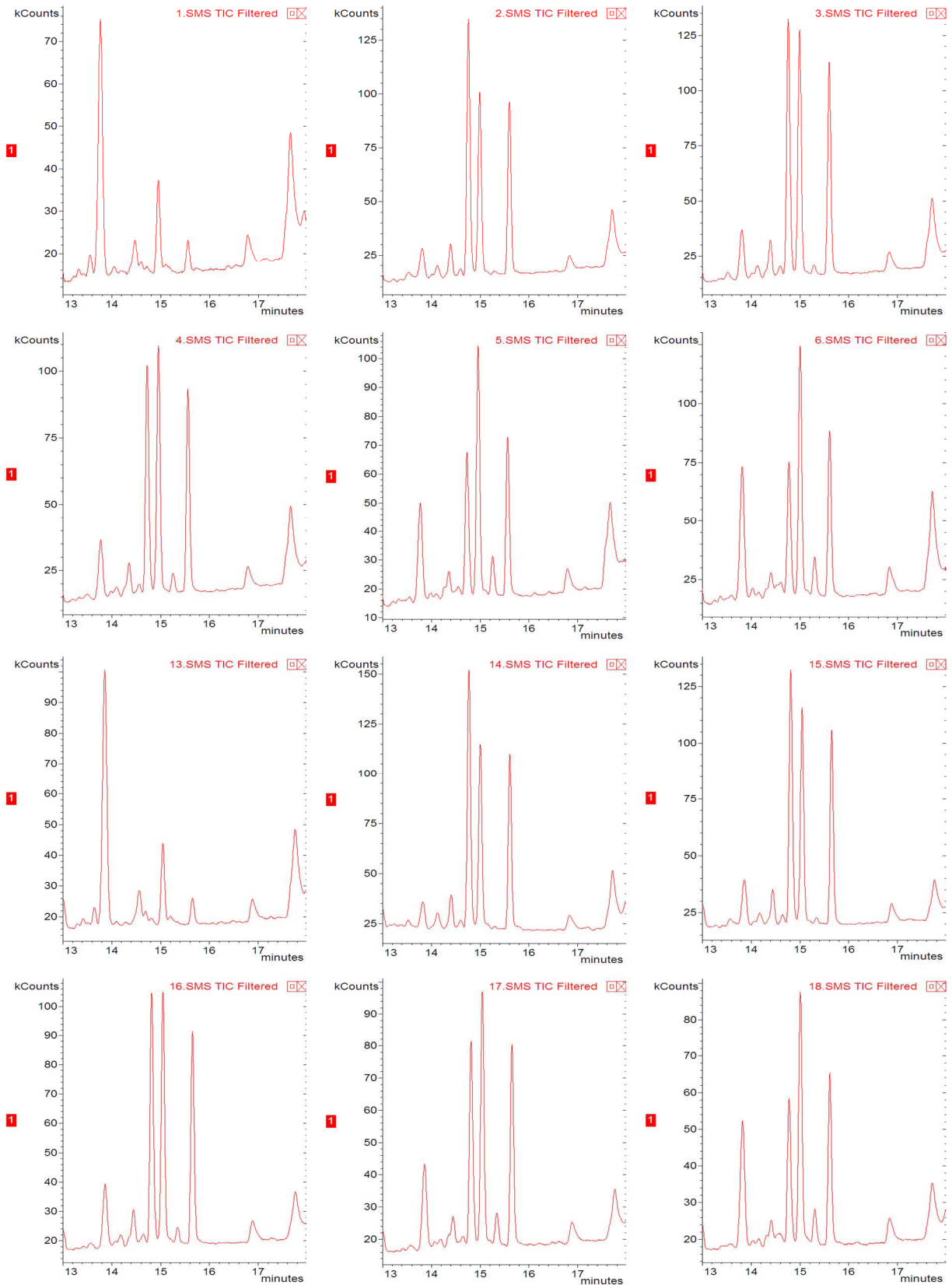
Fortsetzung Zeile...	Description
...1	orf19.4082 DDR48 CGDID:CAL0004933 Assembly 21, Ca21chr2:188969-1890607W Exon(s) only sequence (639 nucleotides)  Immunogenic stress-associated protein; regulated by filamentous growth pathways; induced by benomyl, caspofungin, or in azole-resistant strain; Hog1p, alkaline downregulated; similar to <i>S. cerevisiae</i> Ddr48p (ATP/GTPase, role in DNA repair)
...2	orf19.922 ERG11 CGDID:CAL0003627 Assembly 21, Ca21chr5:149706-148120C Exon(s) only sequence (1587 nucleotides)  Lanosterol 14-alpha-demethylase, member of cytochrome P450 family that functions in ergosterol biosynthesis; target of azole antifungals; may contribute to drug resistance; azole- or biofilm-induced; subject to hypoxic regulation
...3	orf19.7312 ERG13 CGDID:CAL0004537 Assembly 21, Ca21chrR:1952785-1951430C Exon(s) only sequence (1356 nucleotides)  Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Erg13p, which is involved in ergosterol biosynthesis; transposon mutation affects filamentous growth; amphotericin B, caspofungin repressed
...4	orf19.5799 orf19.5799 CGDID:CAL0001560 Assembly 21, Ca21chr2:608308-606248C Exon(s) only sequence (2061 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
...5	orf19.7221 SET3 CGDID:CAL0003900 Assembly 21, Ca21chr1:3118760-3115551C Exon(s) only sequence (3210 nucleotides)  Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Set3p, which is an NAD-dependent histone deacetylase; transposon mutation affects filamentous growth
...6	orf19.3740 PGA23 CGDID:CAL0001195 Assembly 21, Ca21chrR:510509-511357W Exon(s) only sequence (849 nucleotides)  Putative GPI-anchored protein of unknown function; transcription is negatively regulated by Rim101p; regulated by Cyr1p; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p
...7	orf19.4631 ERG251 CGDID:CAL0003665 Assembly 21, Ca21chr4:318197-317232C Exon(s) only sequence (966 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; ketoconazole-induced; amphotericin B, caspofungin repressed
...8	orf19.1631 ERG6 CGDID:CAL0006397 Assembly 21, Ca21chr3:466246-465116C Exon(s) only sequence (1131 nucleotides)  Delta(24)-sterol C-methyltransferase, converts zymosterol to fecosterol in ergosterol biosynthesis by methylating position C-24; mutation confers nystatin resistance; fluconazole-induced; transcription increased in azole-resistant strain
...9	orf19.5285 PST3 CGDID:CAL0003649 Assembly 21, Ca21chrR:1158020-1158619W Exon(s) only sequence (600 nucleotides)  Putative flavodoxin; biofilm induced; fungal-specific (no human or murine homolog)
...10	orf19.3895 CHT2 CGDID:CAL0002204 Assembly 21, Ca21chr5:921556-919805C Exon(s) only sequence (1752 nucleotides)  Chitinase; putative N-terminal catalytic domain, GPI anchor, O-mannosylated region, signal peptide; 3 N-glycosylation motifs; downregulated in core caspofungin response; induced in yeast-form cells; Cyr1p-, Efg1p-, pH-regulated
...11	orf19.767 ERG3 CGDID:CAL0001905 Assembly 21, Ca21chr1:992851-991691C Exon(s) only sequence (1161 nucleotides)  C-5 sterol desaturase; introduces C-5(6) double bond into episterol in ergosterol biosynthesis; clinically-isolated homozygous null mutants show azole resistance, defects in hyphal growth and virulence; Efg1p-repressed; fluconazole-induced
...12	orf19.5178 ERG5 CGDID:CAL0002665 Assembly 21, Ca21chr7:613720-612167C Exon(s) only sequence (1554 nucleotides)  Putative C-22 sterol desaturase; fungal C-22 sterol desaturases are cytochrome P450 enzymes of ergosterol biosynthesis, catalyze formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain; transposon mutation affects filamentous growth
...13	orf19.677 CHO1 CGDID:CAL0001102 Assembly 21, Ca21chr1:2471379-2470558C Exon(s) only sequence (822 nucleotides)  Putative phosphatidylserine synthase, similar to <i>S. cerevisiae</i> Cho1p, which is involved in phosphatidylserine biosynthesis; transposon mutation affects filamentous growth; regulated by Nrg1p, Tup1p; no human or murine homolog
...14	orf19.406 ERG1 CGDID:CAL0005541 Assembly 21, Ca21chr1:1882168-1880678C Exon(s) only sequence (1491 nucleotides)  Squalene epoxidase, catalyzes epoxidation of squalene to 2,3(S)-oxidosqualene in the ergosterol biosynthetic pathway; essential; target of allylamine antifungal drugs; uses NADH as a reducing cofactor, while <i>S. cerevisiae</i> Erg1p uses NADPH
...15	orf19.6081 PHR2 CGDID:CAL0005209 Assembly 21, Ca21chr1:37852-39486W Exon(s) only sequence (1635 nucleotides)  Glycosidase; role in cell wall structure; may act on beta-1,3-glucan prior to beta-1,6-glucan linkage; role in vaginal but not systemic virulence (low pH, not neutral); low pH, high iron, fluconazole-induced; Rim101p-downregulated at pH 8
...16	orf19.6688 orf19.6688 CGDID:CAL0004140 Assembly 21, Ca21chr7:789512-790492W Exon(s) only sequence (961 nucleotides)  Decreased transcription is observed upon benomyl treatment or in an azole-resistant strain that overexpresses MDR1
...17	orf19.391 UPC2 CGDID:CAL0004944 Assembly 21, Ca21chr1:1860407-1858269C Exon(s) only sequence (2139 nucleotides)  Transcription factor involved in regulation of ergosterol biosynthetic genes and sterol uptake; binds ERG2 promoter; has Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster; similar to <i>S. cerevisiae</i> Upc2p; fluconazole-induced; macrophage/pseudohyphal-repressed
...18	orf19.2125 orf19.2125 CGDID:CAL0005305 Assembly 21, Ca21chr8:986080-986635W Exon(s) only sequence (456 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
...19	orf19.7455 orf19.7455 CGDID:CAL0005586 Assembly 21, Ca21chr3:1521617-1520538C Exon(s) only sequence (1090 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
...20	orf19.7668 MAL2 CGDID:CAL0000956 Assembly 21, Ca21chrR:2276897-2278609W Exon(s) only sequence (1713 nucleotides)  Alpha-glucosidase that hydrolyzes sucrose; required for sucrose utilization; transcriptionally regulated by Suc1p; expression induced by maltose, repressed by glucose; transposon mutation affects filamentous growth; upregulated in RHE model
...21	orf19.1327 RBT1 CGDID:CAL0003763 Assembly 21, Ca21chr4:747433-745268C Exon(s) only sequence (2166 nucleotides)  Putative cell wall protein with similarity to Hwp1p, required for virulence, predicted to be cell-wall attached and glycosylated, Tup1p repressed; serum, hyphal and alkaline induced; farnesol, alpha factor induced; Rtg1p-, Rim101p-regulated
...22	orf19.3732 ERG25 CGDID:CAL0001165 Assembly 21, Ca21chrR:527711-528637W Exon(s) only sequence (927 nucleotides)  Putative C-4 methyl sterol oxidase with role in C-4-demethylation of ergosterol biosynthesis intermediates, based on similarity to <i>S. cerevisiae</i> Erg25p; fluconazole-induced; upregulated in biofilm and in azole-resistant strain
...23	orf19.2909 ERG26 CGDID:CAL0005951 Assembly 21, Ca21chr4:1398286-1397234C Exon(s) only sequence (1053 nucleotides)  C-3 sterol dehydrogenase, catalyzes the second of three steps required to remove two C-4 methyl groups from an intermediate in ergosterol biosynthesis; amphotericin B, caspofungin repressed
...24	orf19.2475 PGA26 CGDID:CAL0001610 Assembly 21, Ca21chr1:1204573-1204178C Exon(s) only sequence (396 nucleotides)  Putative GPI-anchored protein of unknown function; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; induced during cell wall regeneration, possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction)
...25	orf19.7314 CDG1 CGDID:CAL0004539 Assembly 21, Ca21chrR:1957893-1958690W Exon(s) only sequence (798 nucleotides)  Protein described as similar to cysteine dioxygenases; expression is regulated upon white-opaque switching
...26	orf19.6840 orf19.6840 CGDID:CAL0005757 Assembly 21, Ca21chr1:920753-920232C Exon(s) only sequence (622 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium
...27	orf19.24 RTA2 CGDID:CAL0005522 Assembly 21, Ca21chr2:1317228-1318589W Exon(s) only sequence (1362 nucleotides)  Putative floppase; required for sphingolipid long chain base release; mediates calcineurin-dependent resistance to azoles; stress-associated protein; Ca2+, calcineurin-regulated; ketoconazole, caspofungin induced; Plc1p-regulated
...28	orf19.5614 orf19.5614 CGDID:CAL0005560 Assembly 21, Ca21chr6:685914-686771W Exon(s) only sequence (858 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
...29	orf19.5635 PGA7 CGDID:CAL0000616 Assembly 21, Ca21chr4:17801-18480W Exon(s) only sequence (660 nucleotides)  Protein described as a putative precursor of a hyphal surface antigen; putative GPI-anchor; induced by ciclopirox oxamine, ketoconazole, or by Rim101p at pH 8; regulated during planktonic growth; induced during cell wall regeneration
...30	orf19.4802 FTH1 CGDID:CAL0005288 Assembly 21, Ca21chr1:2033469-2072195C Exon(s) only sequence (1275 nucleotides)  Protein not essential for viability; similar to <i>S. cerevisiae</i> Fth1p (putative high affinity iron transporter for intravacuolar stores of iron); repressed by Slu1p, amphotericin B, caspofungin; induced by alkaline pH, ciclopirox oxamine
...31	orf19.90 orf19.90 CGDID:CAL0000702 Assembly 21, Ca21chr6:174667-176931W Exon(s) only sequence (2265 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
...32	orf19.6925 HTB1 CGDID:CAL0000206 Assembly 21, Ca21chr3:818354-817962C Exon(s) only sequence (393 nucleotides)  Putative histone H2B; induced upon adherence to polystyrene; amphotericin B or caspofungin repressed; fucytosine or fluconazole induced; regulated by Efg1p
...33	orf19.1847 ARO10 CGDID:CAL0001679 Assembly 21, Ca21chrR:1469568-1467679C Exon(s) only sequence (1890 nucleotides)  Aromatic decarboxylase of the Ehrlich fusel oil pathway of aromatic alcohol biosynthesis; pH-regulated (alkaline downregulated); protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background
...34	orf19.1996 CHA1 CGDID:CAL0002743 Assembly 21, Ca21chr2:215567-216628W Exon(s) only sequence (1062 nucleotides)  Protein similar to serine/threonine dehydratases, catabolic; negatively regulated by Rim101p; expression greater in low iron; regulated on white-opaque switching; filament induced; transposon mutation affects filamentous growth
...35	orf19.5634 FRP1 CGDID:CAL0000614 Assembly 21, Ca21chr4:17454-15790C Exon(s) only sequence (1665 nucleotides)  Predicted ferric reductase; gene alkaline-induced directly by Rim101p; iron-chelation-induced by CCAAT-binding factor (with Hap43p); fluconazole-downregulated; ciclopirox oxamine induced; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p
...36	orf19.1591 ERG10 CGDID:CAL0005678 Assembly 21, Ca21chr2:902615-903823W Exon(s) only sequence (1209 nucleotides)  Protein similar to acetyl-CoA acetyltransferase; role in ergosterol biosynthesis; soluble in hyphae; changes in protein abundance associated with azole resistance; fluconazole or ketoconazole induced; macrophage-downregulated protein
...37	orf19.1321 HWP1 CGDID:CAL0003753 Assembly 21, Ca21chr4:762939-764843W Exon(s) only sequence (1905 nucleotides)  Hyphal cell wall protein; covalently crosslinked to epithelial cells by host transglutaminase; opaque- and a-specific; alpha-factor induced; at MTLA side of conjugation tube; assessment of virulence role complicated by URA3 effects

Fortsetzung Zeile	Sequence Name	target_transcript_ids	transcript_description
1	C.albicans2V10000001	orf19.3321	orf19.3321 orf19.3321 CGDID:CAL0004088 Assembly 21, Ca21chr1:259666-261182W Exon(s) only sequence (1527 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
2	C.albicans2V10000009	orf19.1404	orf19.1404 orf19.1404 CGDID:CAL0004455 Assembly 21, Ca21chr2:1942108-1943511W Exon(s) only sequence (1404 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
3	C.albicans2V10000291	orf19.740	orf19.740 HAP41 CGDID:CAL0001631 Assembly 21, Ca21chr4:1099281-109736C Exon(s) only sequence (1131 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; not required for resistance to low iron; possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction); transcriptionally activated by Mln1p under weak acid stress
4	C.albicans2V10000014	orf19.5067	orf19.5067 orf19.5067 CGDID:CAL0001724 Assembly 21, Ca21chr1:1730783-1731481W Exon(s) only sequence (699 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
5	C.albicans2V10000022	orf19.5662	orf19.5662 PEP7 CGDID:CAL0000689 Assembly 21, Ca21chr4:52683-54020W Exon(s) only sequence (1338 nucleotides)  Vesicle transport protein; acts in endosomal transport; roles in metal ion resistance, vulfence, adhesion, hyphal growth, chlamydospore formation; similar to S. cerevisiae PEP7p
6	C.albicans2V10000303	orf19.5275	orf19.5275 orf19.5275 CGDID:CAL0003620 Assembly 21, Ca21chr1:2607454-2608677W Exon(s) only sequence (1224 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
7	C.albicans2V10000026	orf19.1977	orf19.1977 orf19.1977 CGDID:CAL0002674 Assembly 21, Ca21chr5:211289-210210C Exon(s) only sequence (1077 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
8	C.albicans2V10000034	orf19.3337	orf19.3337 orf19.3337 CGDID:CAL0004125 Assembly 21, Ca21chr1:299627-300365W Exon(s) only sequence (759 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
9	C.albicans2V10000315	orf19.5628	orf19.5628 orf19.5628 CGDID:CAL0000594 Assembly 21, Ca21chr6:714650-715699W Exon(s) only sequence (930 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
10	C.albicans2V10000038	orf19.7055	orf19.7055 orf19.7055 CGDID:CAL0002082 Assembly 21, Ca21chr7:106646-106320C Exon(s) only sequence (327 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction)
11	C.albicans2V10000046	orf19.991	orf19.991 DJP1 CGDID:CAL0003840 Assembly 21, Ca21chr1:2319827-2321353W Exon(s) only sequence (1527 nucleotides)  Similar to bacterial DnaJ; reported to have a role in peroxisome biogenesis; transcriptionally regulated by iron; expression greater in low iron; induced upon adherence to polystyrene
12	C.albicans2V10000327	orf19.4659	orf19.4659 orf19.4659 CGDID:CAL0003731 Assembly 21, Ca21chr4:258350-257073C Exon(s) only sequence (1278 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
13	C.albicans2V10000050	orf19.2070	orf19.2070 orf19.2070 CGDID:CAL0004485 Assembly 21, Ca21chr2:9065-92431W Exon(s) only sequence (1707 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
14	C.albicans2V10000358	orf19.2398	orf19.2398 orf19.2398 CGDID:CAL0000843 Assembly 21, Ca21chrR:729390-728527C Exon(s) only sequence (864 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; possible increased transcription in an azole-resistant strain that overexpresses CDR1 and CDR2; possibly transcriptionally regulated by Tac1p; induced by Mln1p under weak acid stress
15	C.albicans2V10000339	orf19.2901	orf19.2901 NUP60 CGDID:CAL0005940 Assembly 21, Ca21chr4:1412144-1410309C Exon(s) only sequence (1836 nucleotides)  Protein not essential for viability; similar to S. cerevisiae Nup60p, which is a subunit of the nuclear pore complex
16	C.albicans2V10000062	orf19.3968	orf19.3968 orf19.3968 CGDID:CAL0003057 Assembly 21, Ca21chr5:1051721-1052032W Exon(s) only sequence (312 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
17	C.albicans2V10000070	orf19.2906	orf19.2906 FGA41 CGDID:CAL0005946 Assembly 21, Ca21chr4:1403382-1402492C Exon(s) only sequence (891 nucleotides)  Putative GPI-anchored protein of unknown function
18	C.albicans2V10000351	orf19.6260	orf19.6260 orf19.6260 CGDID:CAL0000331 Assembly 21, Ca21chr1:1394401-139293C Exon(s) only sequence (1419 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
19	C.albicans2V10000074	orf19.3426	orf19.3426 ANB1 CGDID:CAL0004932 Assembly 21, Ca21chr6:331257-332450W Exon(s) only sequence (477 nucleotides)  Putative translation initiation factor; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage
20	C.albicans2V10000082	orf19.3965	orf19.3965 orf19.3965 CGDID:CAL0003053 Assembly 21, Ca21chr5:1038734-1038084C Exon(s) only sequence (651 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction)
21	C.albicans2V10000363	orf19.1955	orf19.1955 orf19.1955 CGDID:CAL0002601 Assembly 21, Ca21chr5:266079-266809W Exon(s) only sequence (657 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
22	C.albicans2V10000086	orf19.4703	orf19.4703 orf19.4703 CGDID:CAL0004344 Assembly 21, Ca21chr4:166832-165126C Exon(s) only sequence (1707 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
23	C.albicans2V10000094	orf19.1107	orf19.1107 orf19.1107 CGDID:CAL0001957 Assembly 21, Ca21chr5:84768-84707C Exon(s) only sequence (609 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
24	C.albicans2V10000375	orf19.5289	orf19.5289 orf19.5289 CGDID:CAL0003654 Assembly 21, Ca21chr1:1146425-1140111C Exon(s) only sequence (315 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
25	C.albicans2V10000096	orf19.4792	orf19.4792 orf19.4792 CGDID:CAL0004610 Assembly 21, Ca21chr1:2051811-205138C Exon(s) only sequence (1674 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; Plc1p-regulated; possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction)
26	C.albicans2V10000104	orf19.5864	orf19.5864 UPR1 CGDID:CAL0002407 Assembly 21, Ca21chr3:877331-875694C Exon(s) only sequence (1638 nucleotides)  Protein described as similar to uridine kinase; transcription is downregulated in response to treatment with ciclopirox olamine
27	C.albicans2V10000196	orf19.4195	orf19.4195 orf19.4195 CGDID:CAL0003992 Assembly 21, Ca21chr6:112970-113369W Exon(s) only sequence (399 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
28	C.albicans2V10000109	orf19.6038	orf19.6038 UGA32 CGDID:CAL0005105 Assembly 21, Ca21chr1:118829-114128C Exon(s) only sequence (1752 nucleotides)  Predicted zinc-finger protein of unknown function; has similarity to S. cerevisiae Uga3p, which is a transcription factor involved in the regulation of gamma-aminobutyrate metabolism genes
29	C.albicans2V10000117	orf19.2530	orf19.2530 orf19.2530 CGDID:CAL0002432 Assembly 21, Ca21chrR:340865-340533C Exon(s) only sequence (333 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
30	C.albicans2V10000208	orf19.6198.1	orf19.6198.1 orf19.6198.1 CGDID:CAF007067 Assembly 21, Ca21chr1:1508336-1507818C Exon(s) only sequence (312 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; gene has intron; gene was predicted by Annotation Working Group (AWG), subsequently removed from Assembly 20 by the AWG, and later reinstated (see Locus History)
31	C.albicans2V10000121	orf19.5956	orf19.5956 orf19.5956 CGDID:CAL0003378 Assembly 21, Ca21chr3:1045674-1045531W Exon(s) only sequence (858 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
32	C.albicans2V10000129	orf19.7136	orf19.7136 SP76 CGDID:CAL0002223 Assembly 21, Ca21chr7:934914-93119W Exon(s) only sequence (4206 nucleotides)  Protein similar to S. cerevisiae Sp76p transcription elongation factor; transposon mutation affects filamentous growth; transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis and in clinical isolates from oral candidiasis
33	C.albicans2V10000220	orf19.3828	orf19.3828 orf19.3828 CGDID:CAL0002000 Assembly 21, Ca21chr4:973609-973277C Exon(s) only sequence (933 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction)
34	C.albicans2V10000133	orf19.6698	orf19.6698 orf19.6698 CGDID:CAL0004157 Assembly 21, Ca21chr7:811253-809784C Exon(s) only sequence (1470 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
35	C.albicans2V10000141	orf19.2117	orf19.2117 orf19.2117 CGDID:CAL0005284 Assembly 21, Ca21chr2:21541-22767W Exon(s) only sequence (1227 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21
36	C.albicans2V10000232	orf19.7115	orf19.7115 SACT CGDID:CAL0002847 Assembly 21, Ca21chr7:9430-7593C Exon(s) only sequence (1848 nucleotides)  Protein described as a GTPase activating protein (GAP) for RHO1; downregulated upon adherence to polystyrene; macrophage/pseudohyphal-repressed; transcription is upregulated in RHE model of oral candidiasis and in clinical oral candidiasis
37	C.albicans2V10000145	orf19.4461	orf19.4461 orf19.4461 CGDID:CAL0001906 Assembly 21, Ca21chr1:821342-820980C Exon(s) only sequence (363 nucleotides)  Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21

## Anhang 3

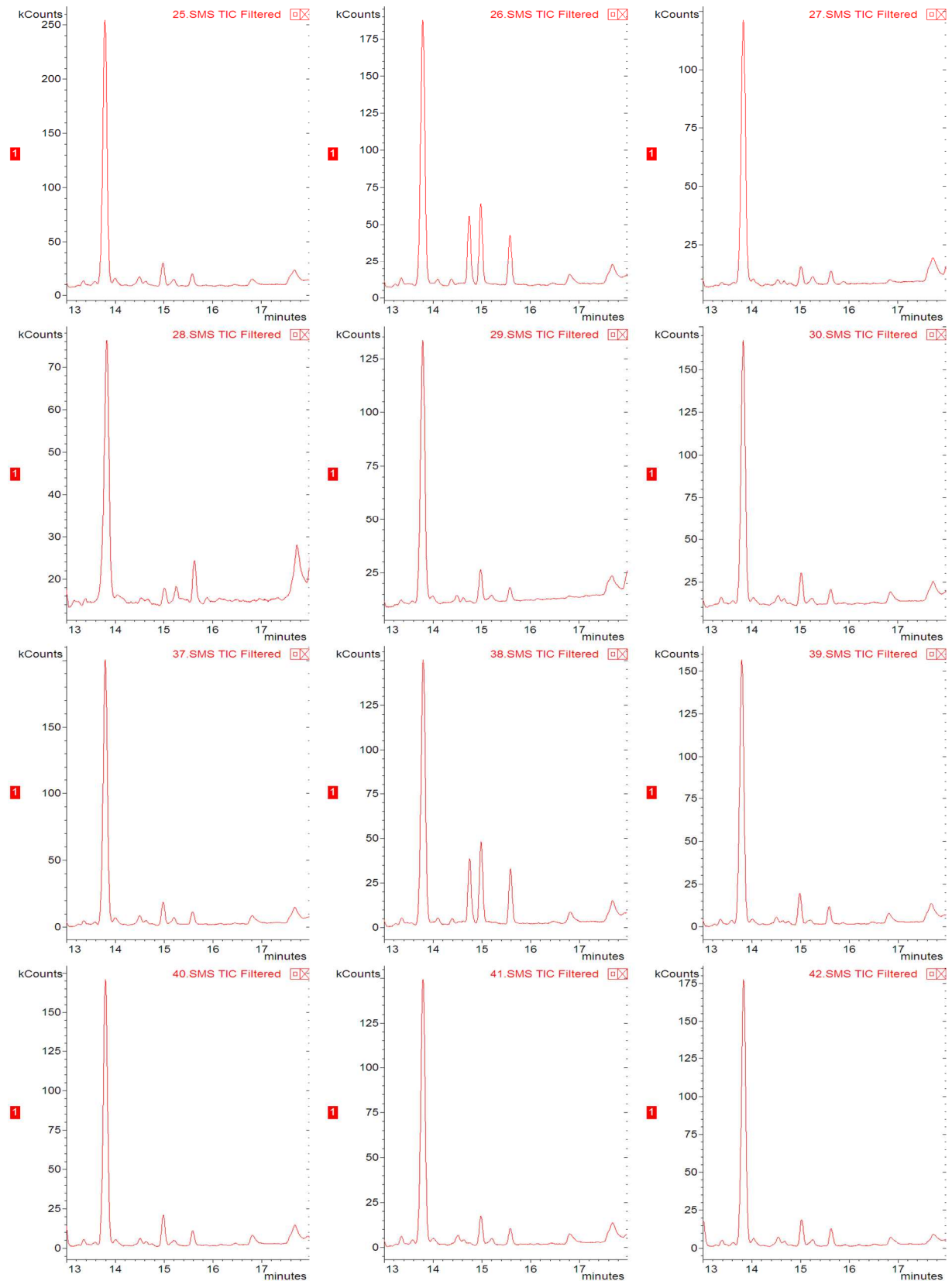
***C. albicans* Can14 (*C. albicans* WT, sensitiv), Fluconazol**

Abfolge Chromatogramme 1-6 und Replikat 13-18: Kontrolle, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml



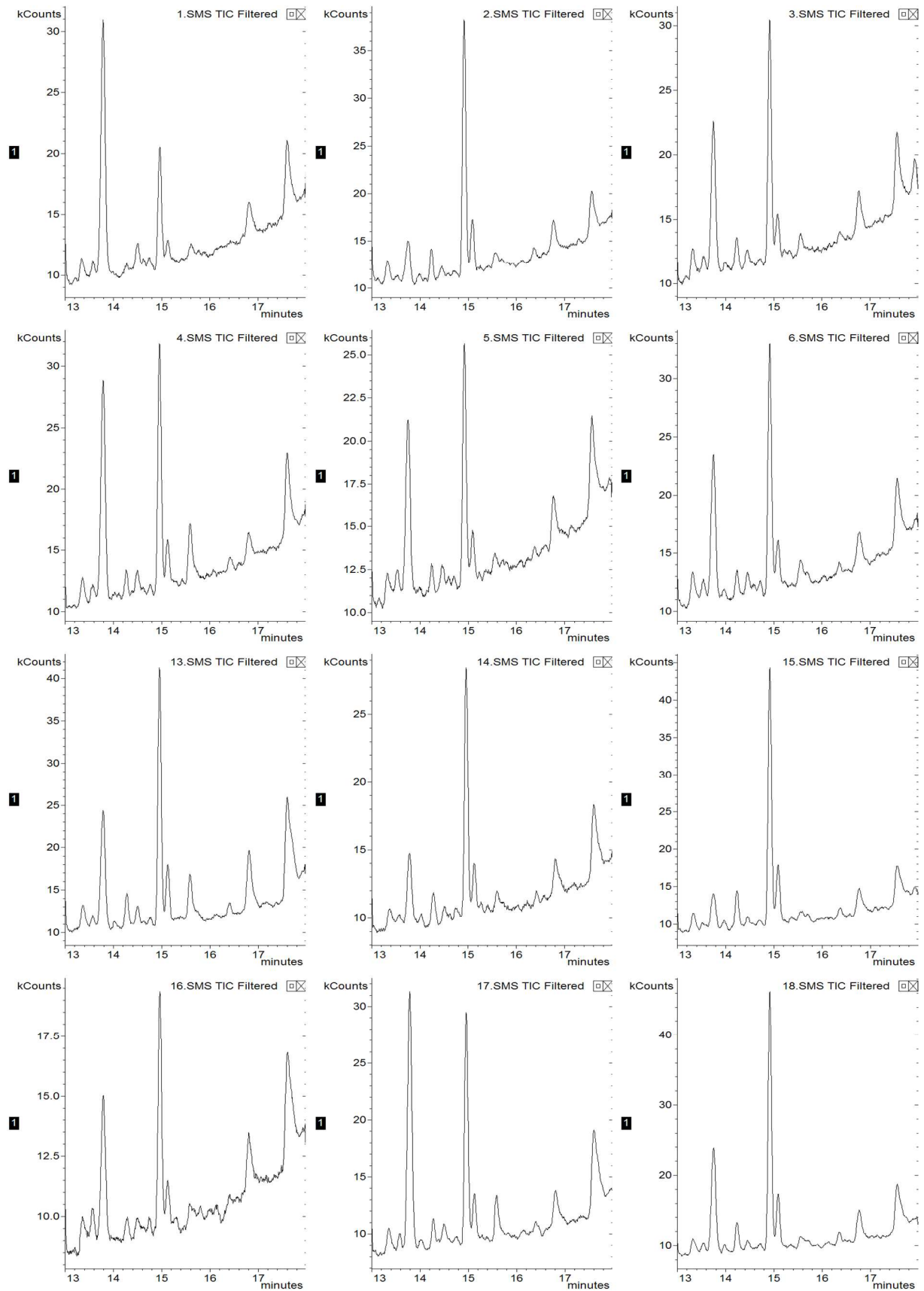
**C. krusei** WT, Fluconazol

Abfolge Chromatogramme SMS 25-30 und Replikat SMS 37-42: Kontrolle, 32 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml



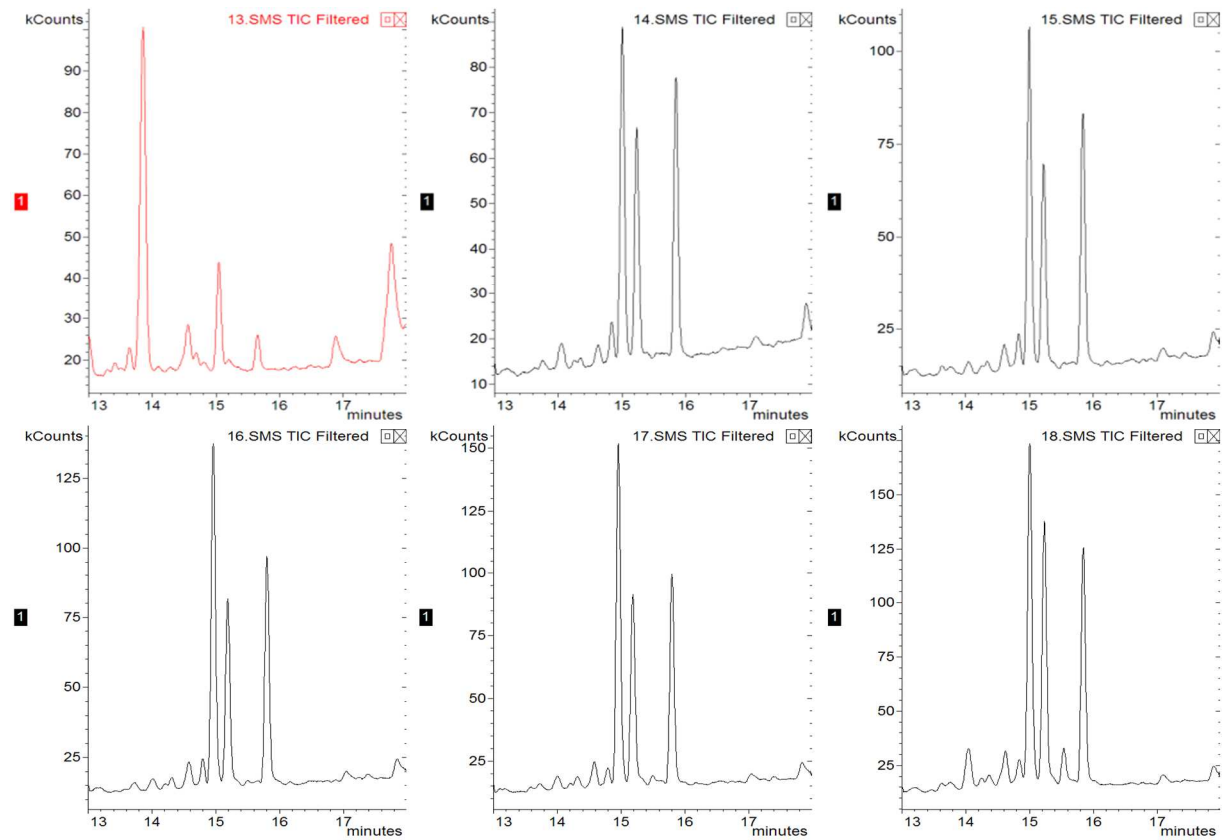
**C. albicans-Isolat Can741, Fluconazol**

Abfolge Chromatogramme 1-6 und Replikat 13-18: Kontrolle, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml



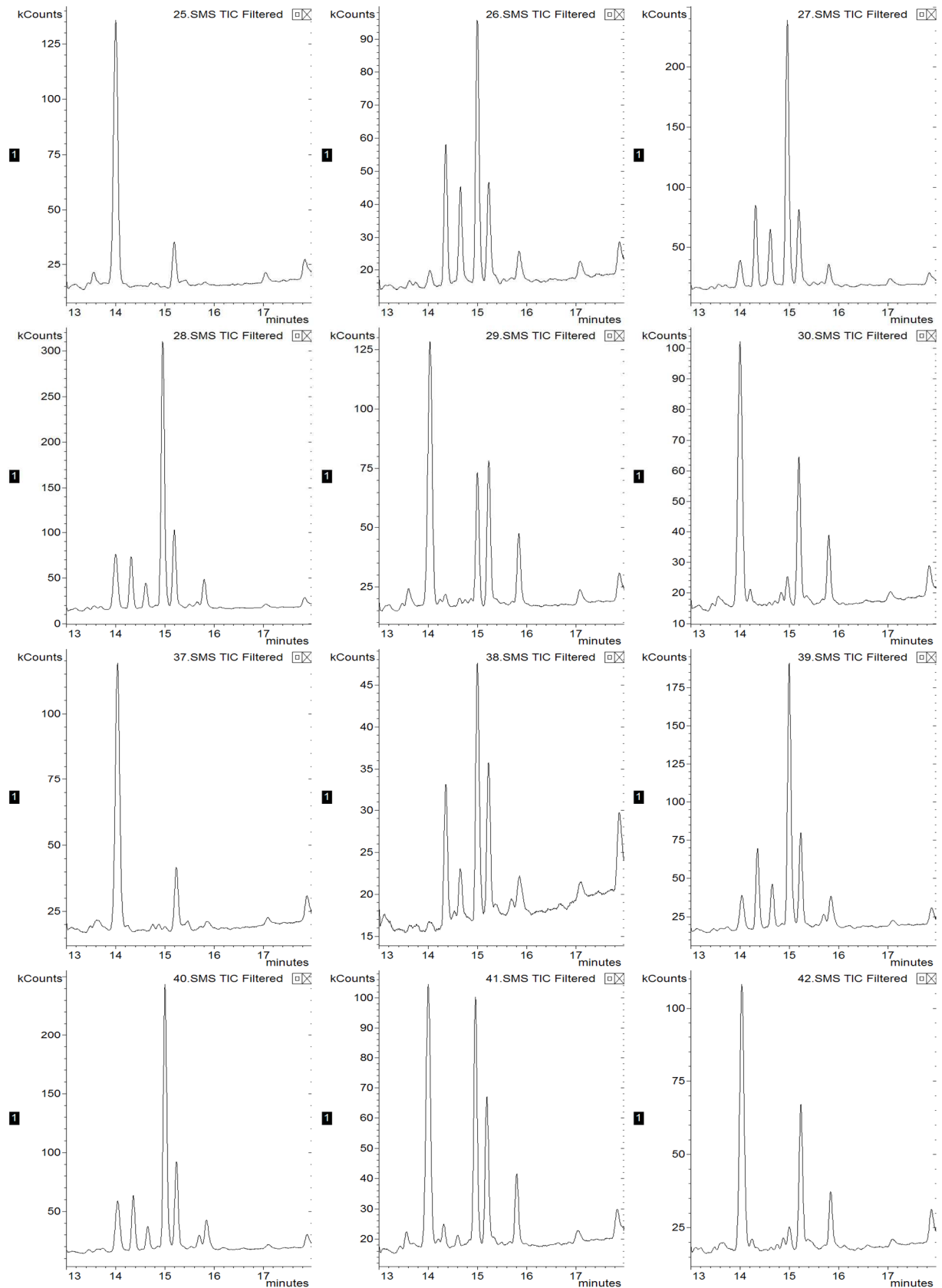
***C. albicans* Can14 (*C. albicans* WT, sensitiv), EMC120B12**

Abfolge Chromatogramme 13-18: Kontrolle, 16 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,125 µg/ml



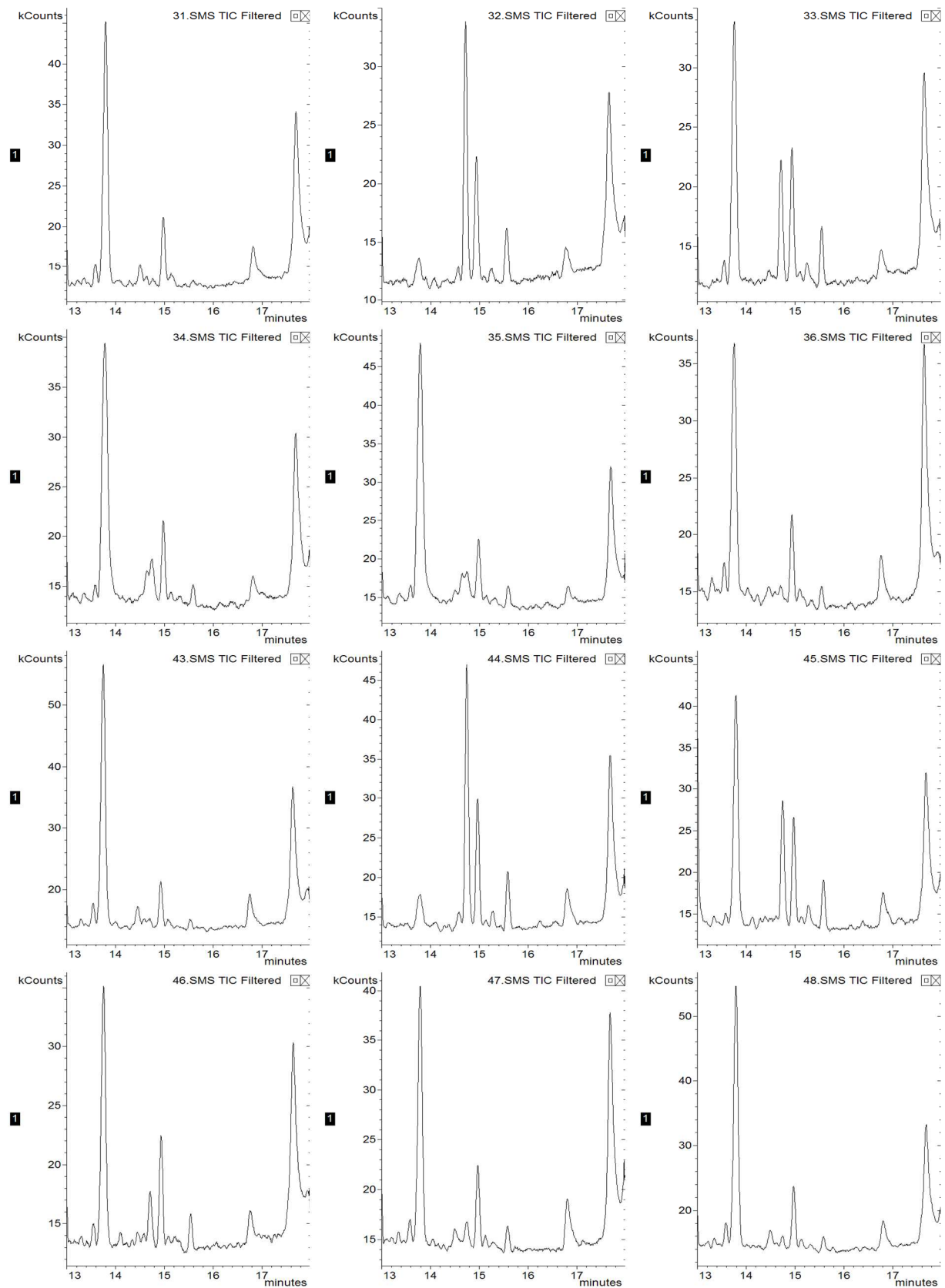
**C. krusei WT, EMC120B12**

Abfolge Chromatogramme SMS 25-30 und Replikat SMS 37-42: Kontrolle, 16 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,125 µg/ml



**C. albicans-Isolat Can741, EMC120B12**

Abfolge Chromatogramme SMS 31-36 und Replikat SMS 43-48: Kontrolle, 16 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 0,125 µg/ml





## Anhang 4

Sample Name	Targets	Ref.	Mean Cp	Mean Cp	Target/Ref.	Normalized
Can14 untreated	UPC2	MS2	24,467222	16,1575536	5,86E-03	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	UPC2	MS2	24,0565446	16,0460128	7,13E-03	1,22
Can14 FLC 1µg/ml	UPC2	MS2	23,8795764	15,2552289	4,64E-03	0,79
Can14 untreated	MDR1	MS2	35,6413509	16,1575536	1,36E-06	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	MDR1	MS2	36,8056144	16,0460128	5,63E-07	0,41
Can14 FLC 1µg/ml	MDR1	MS2	35,8414823	15,2552289	6,35E-07	0,47
Can14 untreated	MRR1	MS2	25,6637479	16,1575536	8,86E-03	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	MRR1	MS2	26,2475952	16,0460128	5,71E-03	0,64
Can14 FLC 1µg/ml	MRR1	MS2	25,542587	15,2552289	5,11E-03	0,58
Can14 untreated	Erg3	MS2	31,064622	16,1575536	3,25E-05	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	Erg3	MS2	30,7679893	16,0460128	3,70E-05	1,14
Can14 FLC 1µg/ml	Erg3	MS2	28,8123559	15,2552289	8,30E-05	2,55
Can14 untreated	Erg6	MS2	34,5237689	16,1575536	2,96E-06	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	Erg6	MS2	34,0999273	16,0460128	3,67E-06	1,24
Can14 FLC 1µg/ml	Erg6	MS2	32,8431514	15,2552289	5,08E-06	1,72
Can14 untreated	Erg11	MS2	21,5607596	16,1575536	3,27E-02	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	Erg11	MS2	21,2984935	16,0460128	3,62E-02	1,11
Can14 FLC 1µg/ml	Erg11	MS2	20,9943976	15,2552289	2,57E-02	0,79
Can14 untreated	CDR1	MS2	20,0074397	16,1575536	8,48E-02	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	CDR1	MS2	20,1705594	16,0460128	7,02E-02	0,83
Can14 FLC 1µg/ml	CDR1	MS2	20,0068573	15,2552289	4,54E-02	0,54
Can14 untreated	CDR2	MS2	28,0845877	16,1575536	2,57E-04	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	CDR2	MS2	28,2988897	16,0460128	2,05E-04	0,80
Can14 FLC 1µg/ml	CDR2	MS2	27,9495941	15,2552289	1,51E-04	0,59
Can14 FLC 0,25 µg/ml	UPC2	MS2	24,0565446	16,0460128	7,13E-03	1,22
Can14 FLC 1µg/ml	UPC2	MS2	23,8795764	15,2552289	4,64E-03	0,79
Can14 untreated	MDR1	MS2	35,6413509	16,1575536	1,36E-06	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	MDR1	MS2	36,8056144	16,0460128	5,63E-07	0,41
Can14 FLC 1µg/ml	MDR1	MS2	35,8414823	15,2552289	6,35E-07	0,47
Can14 untreated	MRR1	MS2	25,6637479	16,1575536	8,86E-03	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	MRR1	MS2	26,2475952	16,0460128	5,71E-03	0,64
Can14 FLC 1µg/ml	MRR1	MS2	25,542587	15,2552289	5,11E-03	0,58
Can14 untreated	Erg3	MS2	31,064622	16,1575536	3,25E-05	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	Erg3	MS2	30,7679893	16,0460128	3,70E-05	1,14
Can14 FLC 1µg/ml	Erg3	MS2	28,8123559	15,2552289	8,30E-05	2,55
Can14 untreated	Erg6	MS2	34,5237689	16,1575536	2,96E-06	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	Erg6	MS2	34,0999273	16,0460128	3,67E-06	1,24
Can14 FLC 1µg/ml	Erg6	MS2	32,8431514	15,2552289	5,08E-06	1,72
Can14 untreated	Erg11	MS2	21,5607596	16,1575536	3,27E-02	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	Erg11	MS2	21,2984935	16,0460128	3,62E-02	1,11
Can14 FLC 1µg/ml	Erg11	MS2	20,9943976	15,2552289	2,57E-02	0,79
Can14 untreated	CDR1	MS2	20,0074397	16,1575536	8,48E-02	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	CDR1	MS2	20,1705594	16,0460128	7,02E-02	0,83
Can14 FLC 1µg/ml	CDR1	MS2	20,0068573	15,2552289	4,54E-02	0,54
Can14 untreated	CDR2	MS2	28,0845877	16,1575536	2,57E-04	1,00
Can14 FLC 0,25 µg/ml	CDR2	MS2	28,2988897	16,0460128	2,05E-04	0,80
Can14 FLC 1µg/ml	CDR2	MS2	27,9495941	15,2552289	1,51E-04	0,59



## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Hirth** für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) der Universität Stuttgart herzlich bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch **apl. Prof. Dr. Steffen Rupp** für die Bereitschaft diese Arbeit als Hauptberichter zu prüfen. Zudem möchte ich ihm für das spannende Thema meiner Arbeit danken. Herzlichen Dank auch für die engagierte Betreuung und wissenschaftliche Anleitung, die ständige Diskussionsbereitschaft und für die Möglichkeit des stetigen wissenschaftlichen Austausches mit Kollegen auf Tagungen und Workshops.

Ganz herzlich danken möchte ich auch **Prof. Dr. Kontermann** für sein Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen **Projektpartnern** möchte ich für die gute Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch danken. Dabei geht ein großer Dank an Herrn **Dr. Christoph Müller** für das Messen der GC/MS-Proben und die produktiven Diskussionen zur Sterolanalytik.

Herrn **Dr. Ekkehard Hiller** gilt mein besonderes Dankeschön für die Unterstützung bei allen Fragen zu jeglicher wissenschaftlicher Thematik, für die hervorragende Betreuung im Labor, für die lustigen und kreativen Gespräche und natürlich für die großartige Zeit in unseren Büros. Danke für die Motivation und die Unterstützung!

Ein großes Dankeschön für den Fleiß und den Ehrgeiz bei ihrer engagierten Durchführung der Diplomarbeit geht auch an **Isabel Engelhardt**. Danke auch für unsere Freundschaft! Ein großer Dank geht auch an **Eva Glink** (geb. Heim) für ihre tolle Mitarbeit während ihres Praktikums. Danke für euer Interesse an dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei der **gesamten Arbeitsgruppe** und bei allen Kollegen der **Abteilung Molekulare Biotechnologie** für die stetige Hilfsbereitschaft und für das tolle Arbeitsklima bedanken. In solch einer tollen Atmosphäre hat mir die Arbeit immer sehr viel Freude bereitet.

Für seinen Beistand und den stetigen Rückhalt auf unserem gemeinsamen Weg möchte ich mich bei **Jan Haag** aus tiefsten Herzen bedanken. Danke, dass du mit mir den Weg seit dem Abitur immer mit so viel Ruhe und Verständnis gehst und immer für mich da bist.

Ein besonderer Dank gilt auch **meinem Bruder**, der ebenfalls immer für mich da ist und mich auch bei wissenschaftlichen Fragen schon seit dem Studium sehr unterstützt hat. Ohne ihn und meine Familie, und dabei vor allem ohne meine Eltern, wären mein Weg und diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Daher geht mein größter Dank an **meine Mutter und meinen Vater**. Ich möchte ihnen für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich danken! Daher widme ich diese Arbeit meinen Eltern als Dankeschön für einfach alles!

---

## Lebenslauf

Petra Doris Keller

geboren am 02.02.1984

in Stuttgart-Bad Cannstatt

seit 03/2014

### **Derzeitige Beschäftigung**

Angestellte bei Bionorica SE

seit 06/2009

### **Promotion**

am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und  
Plasmatechnologie IGVP an der Universität Stuttgart

12/2008 – 05/2009

### **Wissenschaftliche Angestellte**

am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und  
Bioverfahrenstechnik IGB

10/2003 – 11/2008

### **Studium der Agrarbiologie (Diplom)**

an der Universität Hohenheim

Hauptfächer: Biotechnologie und Molekularbiologie

Großpraktikum Biotechnologie (1 Semester)

am Institut für Phytomedizin, FG Angewandte Entomologie

Diplomarbeit am Institut für Phytomedizin,

FG Phytopathologie bei Dr. A. Walz

Titel der Diplomarbeit:

“Untersuchung zur Rolle der MAP-Kinasen in *Sclerotinia  
sclerotiorum*”

09/1990 – 07/2003

### **Schulbildung**

Grundschule Leutenbach und

Lessing Gymnasium Winnenden

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Leistungskurse: Französisch und Biologie

Auszeichnung: Fachpreis in Musik



## Publikationen

### Veröffentlichungen

2010

Burger-Kentischer A., Finkelmeier D., Keller P., Bauer J., Eickhoff H., Kleymann G., Abu Rayyan W., Singh A., Schröppel K., Lemuth K., Wiesmüller K.H., Rupp S.

„A screening assay based on host-pathogen interaction models identifies a set of novel antifungal benzimidazole derivatives”

Antimicrob Agents Chemother (AAC) 55(10): 4789-801.

2011

Keller P.

Mykologie-Forum, DMyKG, Ausgabe 3/11 und 1/12 ISSN-Nr.: 1439-5673, S. 21-22, Beitrag zum Posterpreis mit dem Titel:

„Identifizierung und Charakterisierung neuer antimykotischer Wirkstoffe“.

2012

Masetre-Reyna M., Diderrich R., Veelders M.S., Eulenburg G., Kalugin V., Bruckner S., Keller P., Rupp S., Mosch H.U., Essen L.O.

“Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia”

Proc Natl Acad Sci USA (PNAS) 109(42): 16864-9.

2015

Diderrich R, Kock M, Maestre-Reyna M, Keller P, Steuber H, Rupp S, Essen LO, Mösch HU.

„Structural Hot Spots Determine Functional Diversity of the *Candida glabrata* Epithelial Adhesin Family“

J Biol Chem. 2015 Aug 7; 290(32): 19597-613. doi: 10.1074/jbc.M115.655654. Epub 2015 Jun 23.

2015

Keller P., Müller C., Engelhardt I., Hiller E., Lemuth K., Eickhoff H., Wiesmüller K.-H., Burger-Kentischer A., Bracher F., Rupp S.

„An Antifungal Benzimidazole Derivative Inhibits Ergosterol Biosynthesis and Reveals Novel Sterols“

Antimicrob Agents Chemother (AAC) 2015 Oct; 59(10):6296-307.

### **Vorträge auf Kongressen und Workshops**

März 2011

Workshop of the DGHM working group eukaryotic pathogens, Düsseldorf,  
“Identification and characterisation of novel antifungal compounds”

February 2013

Workshop of the DGHM working group eukaryotic pathogens, Hannover,  
“Novel sterols in *Candida krusei* identified by novel antifungal compounds”

Mai 2013, Nizza / La Colle sur Loup, Frankreich,

4th FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens

“Novel sterols in *Candida krusei* identified by novel antifungal compounds”

### **Poster-Präsentationen**

September 2009, Göttingen

61. Jahrestagung der DGHM

„Identification of novel antifungal compounds using a HTS activity-selectivity assay”

März 2010, Hannover

3. Gemeinsame Jahrestagung von DGHM und VAAM

“Identification of novel antifungal compounds using a HTS activity- selectivity assay”

September 2010, Heidelberg

Chemical Biology 2010

“Identification of novel antifungal compounds using a HTS activity- selectivity assay”

Mai 2011, Nizza / La Colle sur Loup, Frankreich

3rd FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens

“Identification and characterisation of novel antifungal compounds using a screening assay based on host-pathogen interaction models”



September 2011, Kiel

45. Wissenschaftliche Tagung der  
Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V.

“Identifizierung und Charakterisierung von neuen antimykotischen Komponenten  
mittels einer Screening-Methode, die auf einem Wirt-Pathogen-Interaktionsmodell  
basiert“

März / April 2012, Marburg

11th European Conference on Fungal Genetics (ECFG11)

“Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal  
human pathogens”

Juni 2012, Berlin

18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology

“Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal  
human pathogens”

September /Oktober 2012, Hamburg,

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für  
Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V.

“Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal  
human pathogens”

Mai 2013, Nizza / La Colle sur Loup, Frankreich,

4th FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens

“Novel sterols in *Candida krusei* identified by novel antifungal compounds”

März 2014, Tübingen,

Annual Meeting on Frontiers in Medicinal Chemistry

Eickhoff H., Engelhardt I., Hiller E.; Keller P.D., Müller C., Rupp S., Bracher F.,  
Wiesmüller K-H.

Antifungal benzimidazole EMC120B12 confirmed as sterol C14-demethylase  
inhibitor leading to unusual sterol patterns in *Candida krusei*

2011 Berlin, Molecular Devices

Genepix Summit 2011

Lemuth, K., Hiller, E, Hartmann, SC, Weishaupt, S, Keller, P, Rupp, S

„DNA-Microarrays für die Infektionsforschung und Diagnostik am Fraunhofer IGB“

Oktober 2013, Freiburg

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft

Müller C; Keller PD; Engelhardt I; Hiller E; Rupp S; Eickhoff H;

Wiesmüller K-H; Bracher F

Accumulation of novel sterols caused by a new antifungal sterol C14-demethylase inhibitor

November 2013, Würzburg

Sonderforschungsbereich 630: Novel Agents against Infectious Diseases- An Interdisciplinary Approach

Müller C, Keller PD, Engelhardt I, Hiller E, Rupp S, Eickhoff H,

Wiesmüller K-H, Bracher F

Old target- new effects: Accumulation of novel sterols caused by the new antifungal EMC120B12.

### **Posterpreise**

September 2011 Kiel:

45. Wissenschaftliche Tagung der

Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V.

Gewinner in der Kategorie Antimykotische Therapie / Antimykotika

März / April 2012, Marburg:

11th European Conference on Fungal Genetics (ECFG11)

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Wörtliche oder sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Petra Keller

Stuttgart, April 2016