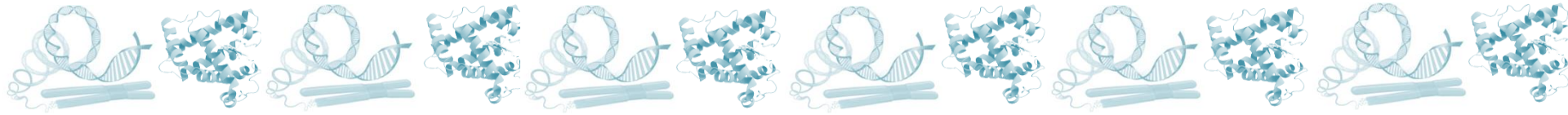
A large, light blue, semi-transparent DNA double helix is the background for the title. It is oriented vertically and has a slight 3D effect with shading.

Homo- und-heterozygote Mutationen im *FKS* Gen und deren Einfluss auf die *in vitro* und *in vivo* Empfindlichkeit von *Candida albicans*

Mag. Dr. rer. nat. Michaela Lackner

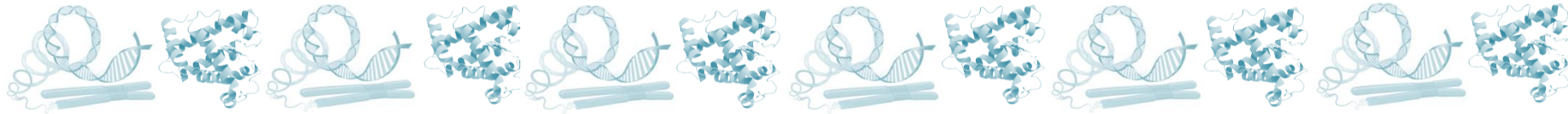
Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiobiologie

Medizinische Universität Innsbruck



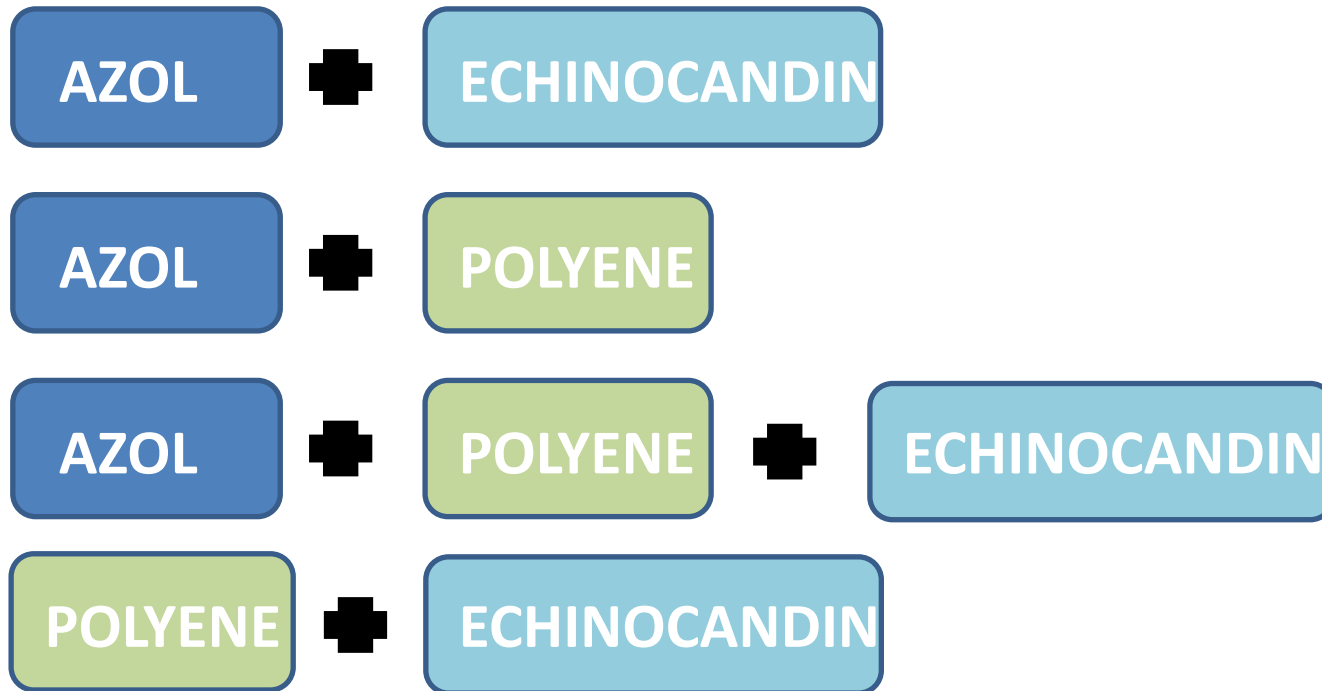
Inhalt

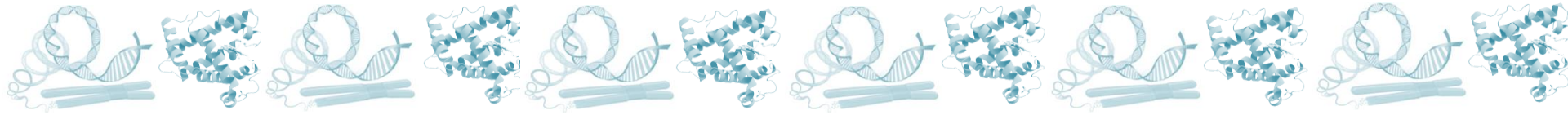
- (1) Definitionen**
- (2) Risikogruppen für Kreuz-Resistenzen und Multi-Resistenzen**
- (3) Häufige Kreuzresistenzen bei *Candida***
- (4) Homo- und Heterozygote Punktmutationen im *FKS* Gen
und deren Auswirkungen auf die *in vitro* und *in vivo* Resistenz**
- (5) Schlussfolgerungen**
- (6) Zukunftsausblick**



Multi-Resistenzen

= Resistenzen zwischen unterschiedlichen Substanzklassen mit verschiedenen zellulären Angriffspunkten



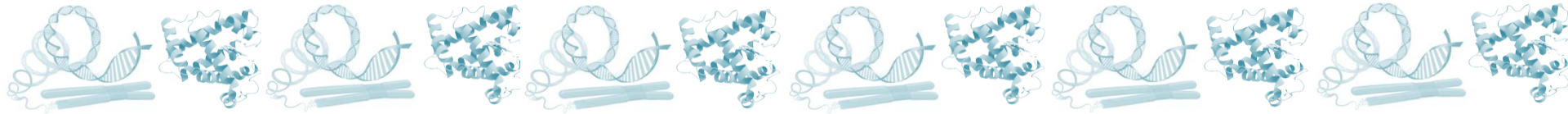


Kreuzresistenz

= Resistenzen zwischen Wirkstoffen der gleichen Substanzklassen mit demselben zellulären Angriffspunkt

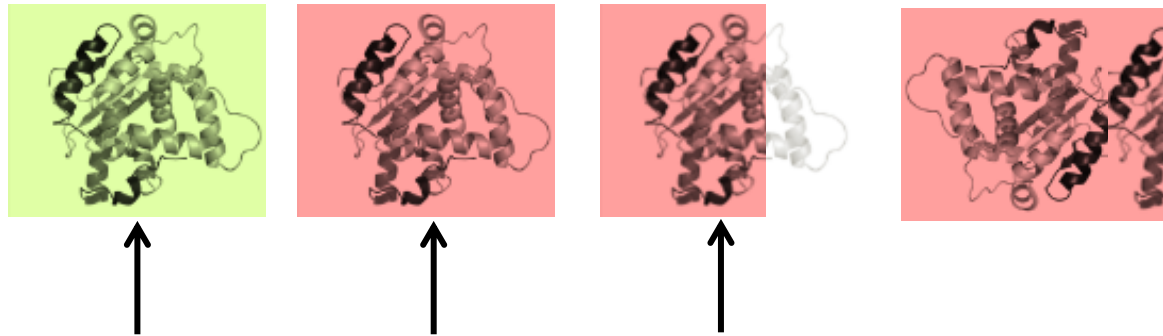
AZOL - AZOL

ECHINOCANDIN - ECHINOCANDIN

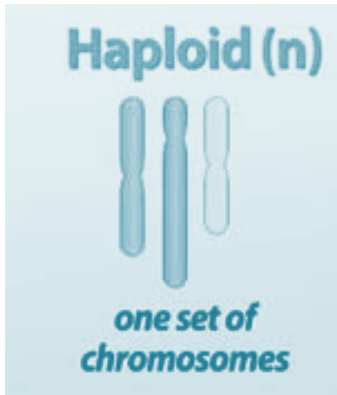


Arten von Mutationen

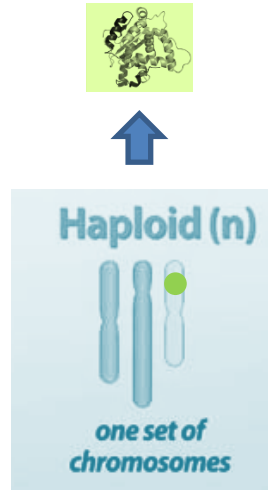
Triplet von Nukleinsäuren kodiert eine Aminosäure, 61 Basetriplets codieren 20 Aminosäuren.



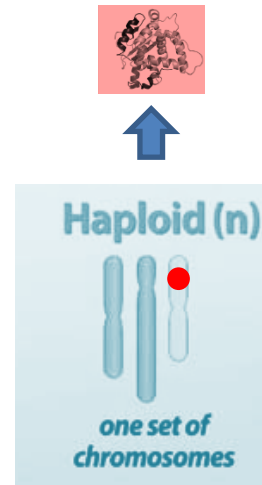
Mutationstyp	<i>silent</i>	<i>missense</i>	<i>nonsense</i>	<i>readthrough</i>
codierte Aminosäure	Gly	His	Stop	Leu
mutierte Base (mRNA)	GGA	CAU	UAA	UUA
Basetriplets (DNA) codierte Aminosäuren	ATGGGC	ATT CGT	AGC TAT	CCA TAAAA
	Met Gly	Ile Arg	Ser Tyr	Pro Stop



z.B. *C. glabrata*



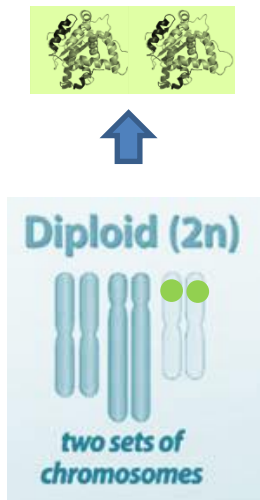
WT



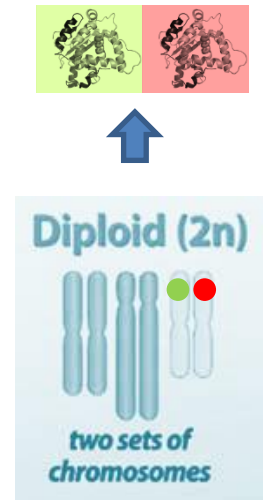
Mutation



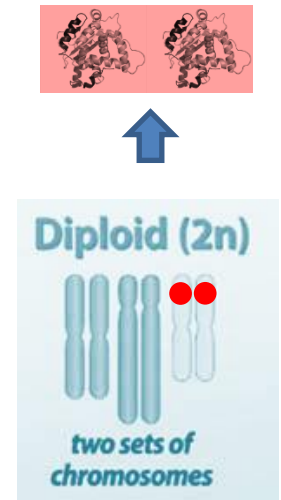
z.B. *C. albicans*



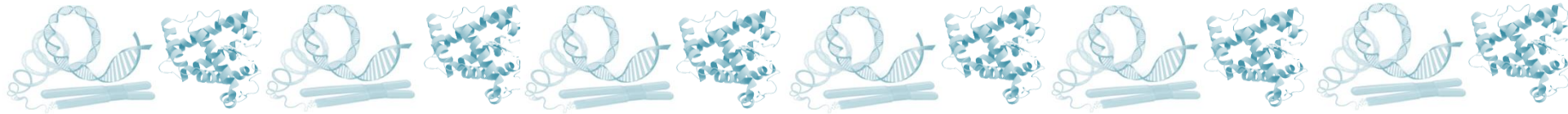
WT



heterozygote
Mutation



homozygote
Mutation



Hot Spot Regionen der Resistenzgene *ERG11*, *FKS1*, und *FKS2* bei *Candida* spp.

ERG11 (lanosterol 14- α -demethylase)

HS1	AS	105-165
HS2	AS	266-287
HS3	AS	405-488

Azol-Resistenz

FKS1 (1,3-beta –glucan synthase complex)

HS1	AS	641-649
HS2	AS	1345-1365

Echinocandin-Resistenz

FKS2 (1,3-beta –glucan synthase complex)

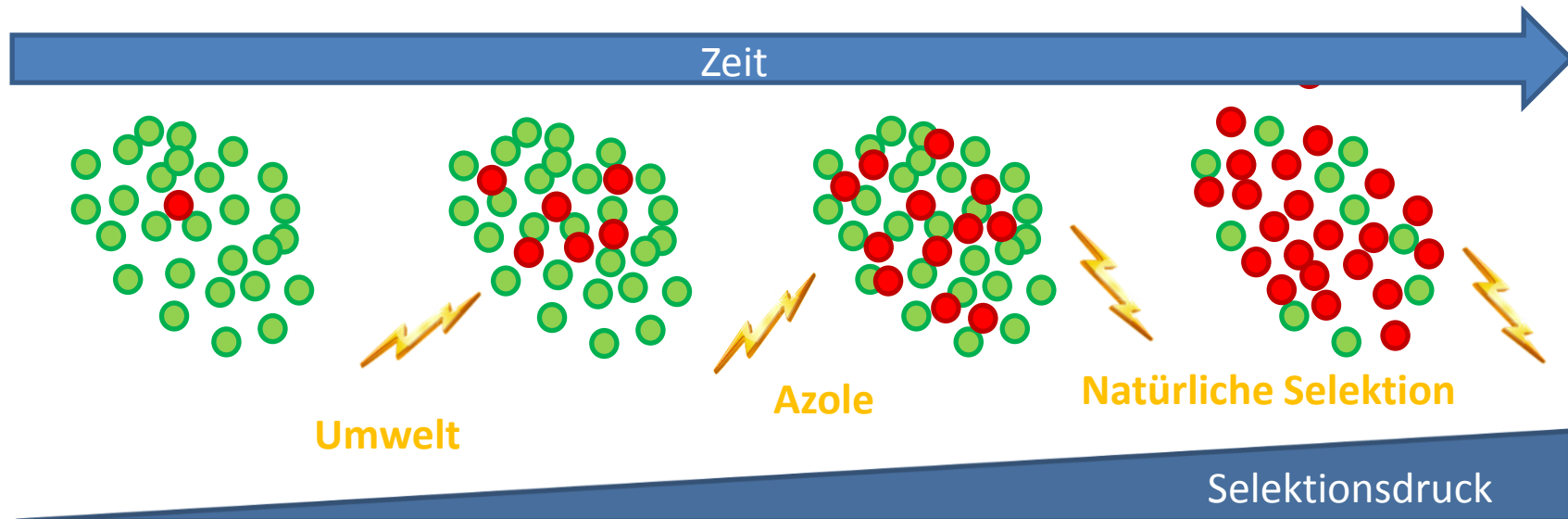
HS1	AS	659-667
HS2	AS	1374-1381

Entstehungsweise von Mutationen/Resistenzen

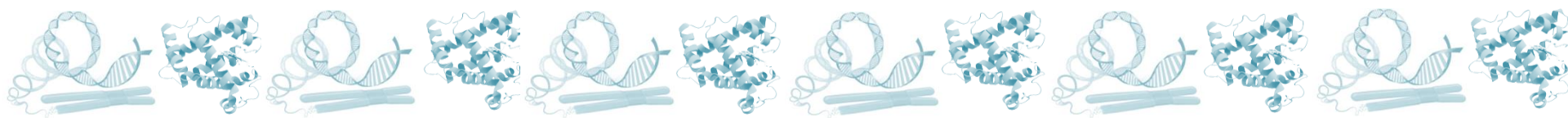
Exogen entstandene Mutationen

Mutationen/Resistenzen welche sich durch den Selektionsdruck in der Umwelt selektioniert wurden.

z.B. Azol-resistente *Aspergillus fumigatus* Isolate in den Niederlanden und Azoleinsatz in der Landwirtschaft¹



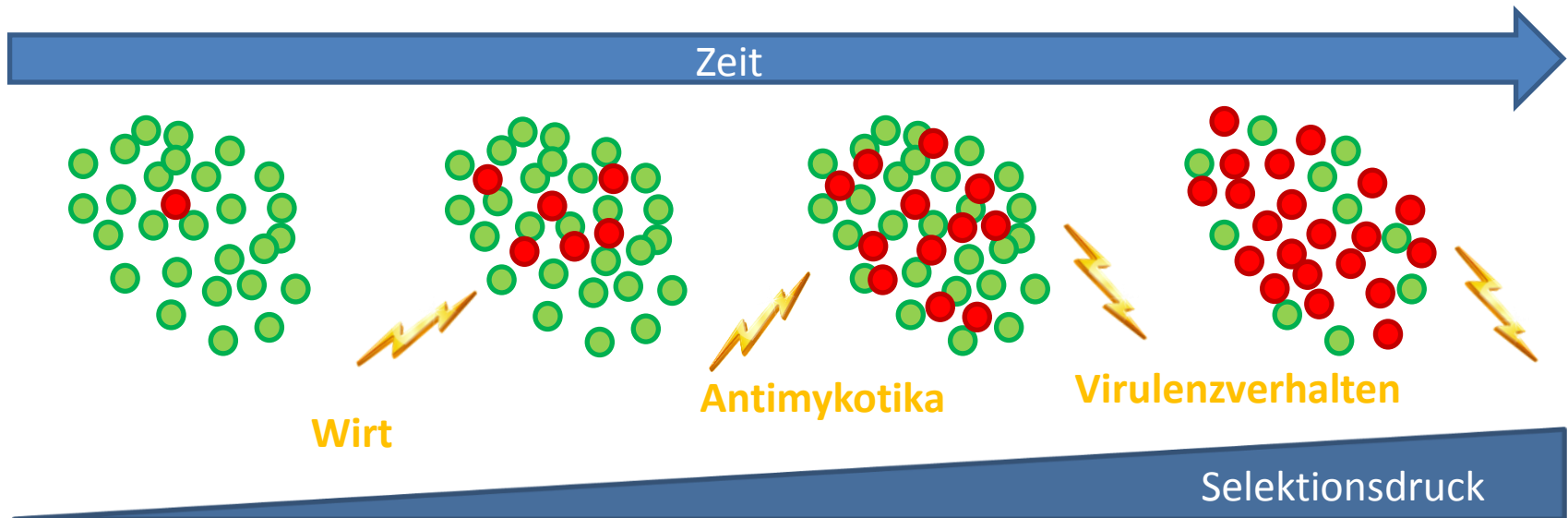
¹[Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus*](#). Verweij PE, Kema GH, Zwaan B, Melchers WJ. Pest Manag Sci. 2013 Feb;69(2):165-70.



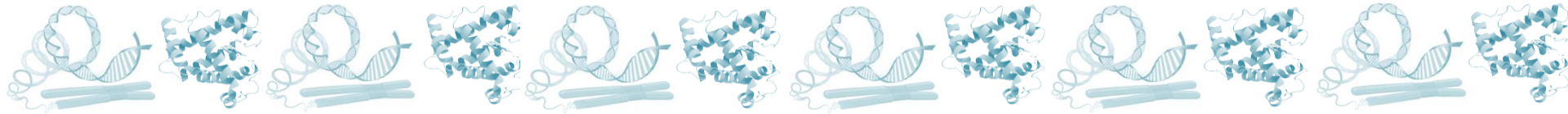
Endogen entstandene Mutationen

Mutationen welche sich im Patienten entwickeln unter Antimykotikatherapie

z.B. *Candida* spp. und Fluconazolresistenz durch zu geringe Antimykotikadosen¹



¹Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. [Barchiesi F, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jun;44\(6\):1578-84.](#)



Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Infektion mit kreuz- oder multi-resistenten Isolaten

- chronisch infizierte Patienten z.B. (CMC, CF-Patienten)¹
- Patienten mit Langzeitantimykotikatherapie²
- Patienten die eine zu geringe Antimykotikadosierung erhalten³

Bei welchen Erregern kommen diese vor?

Hauptsächlich *C. glabrata*, *C. krusei*, und *C. albicans*.



¹[Positions and Numbers of FKS Mutations in *Candida albicans* Selectively Influence In Vitro and In Vivo susceptibilities to Echinocandin Treatment.](#) Lackner M, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul;58(7):3626-35.

²[Does long-term itraconazole prophylaxis result in in vitro azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses study group.](#) Goldman M, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jun;44(6):1585-7..

³Impact of Antimicrobial Dosing Regimen on Evolution of Drug Resistance In Vivo: Fluconazole and *Candida albicans*. [D. Andes](#) et al. Antimicrob Agents Chemother. Jul 2006; 50(7): 2374–2383.

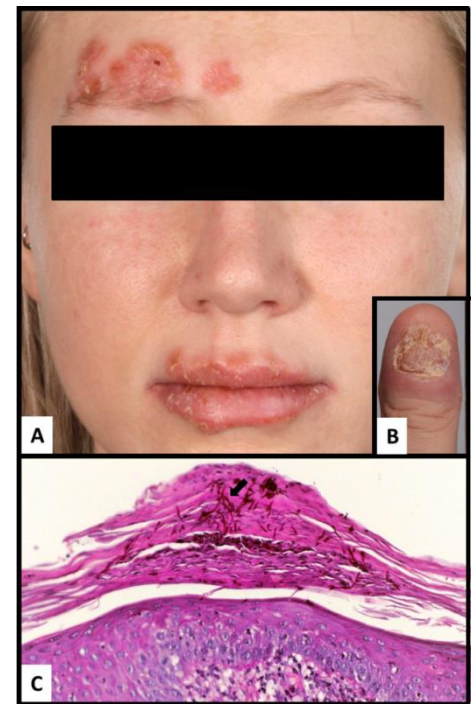
Positions and Numbers of *FKS* Mutations in *Candida albicans* Selectively Influence *In Vitro* and *In Vivo* Susceptibilities to Echinocandin Treatment

M. Lackner,^a M. Tscherner,^b M. Schaller,^c K. Kuchler,^b C. Mair,^{a*} B. Sartori,^a F. Istel,^b M. C. Arendrup,^d C. Lass-Flörl^a

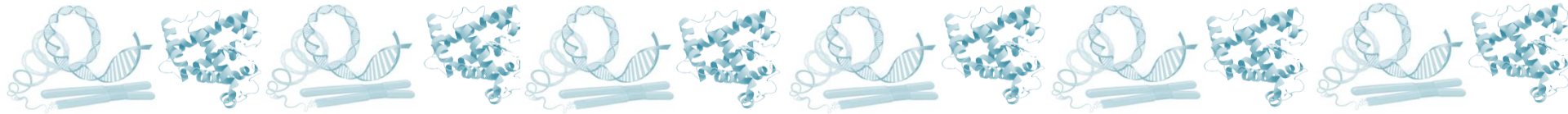
Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria^a; Medical University of Vienna, Department for Medical Biochemistry, Max F. Perutz Laboratories, Vienna, Austria^b; Universitäts-Hautklinik Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Germany^c; Unit of Mycology, Microbiology and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark^d

Therapie

- 2005:** klinisches Ansprechen auf Caspofungin (50 mg/d) nach 12 Monaten Therapie
- 2007:** Rückfall
- 2007-10:** abwechselnd Voriconazol (2 x 200mg/d), Posaconazol (2 x 800 mg/d); teilweise Verbesserung
- 2010:** i.v. Caspofungin (50mg/d) für 2 Jahre; stetige Verbesserung.
- 03/2012:** Fulminante Infektion unter Caspofungin Therapie
- 10/2012:** Abheilen der Infektion unter 100 mg/d Anidulafungin.



CMC-Patientin



Erreger: *Candida albicans*

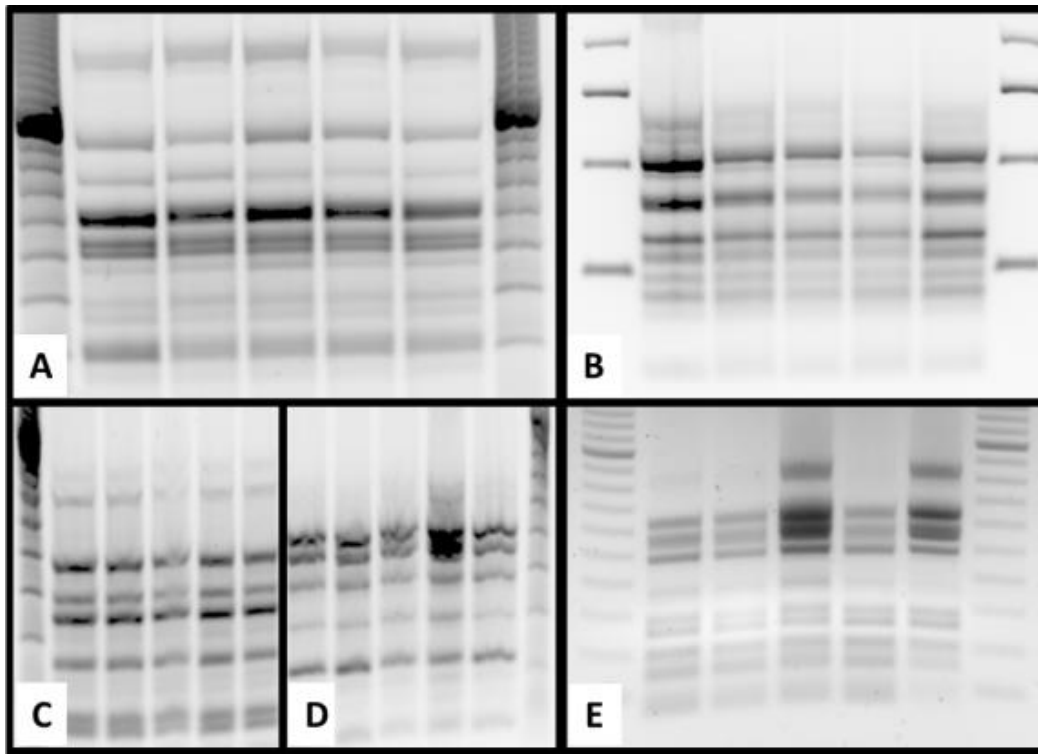
Isolat 2004

Isolate	EUCAST MIC					Etest® MIC	
	ANI	MICA	VOR	ISA	FLU	CAS	AMB
S _{CL} 1130.04	≤0.008 (S)	≤0.008 (S)	0.5 (R)	0.06	>16 (R)	0.125 (S)	0.5 (S)
RR _{CL} 110.12	0.03 (S)	>1 (R)	4 (R)	0.5	>16 (R)	2 (R)	0.5 (S)

Isolat 2012

Zeitspanne: 8 Jahre

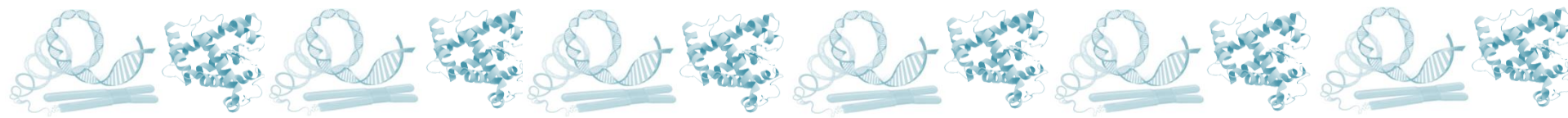
Exogen oder endogen erworbene Resistenz?



Ident für alle 5
Marker

RAPD Typisierung

***In vivo* erworbene Resistenz:**
pan- Azol-Resistenz
Caspofungin-Resistenz
Micafungin-Resistenz



NS- und AS-Mutationen

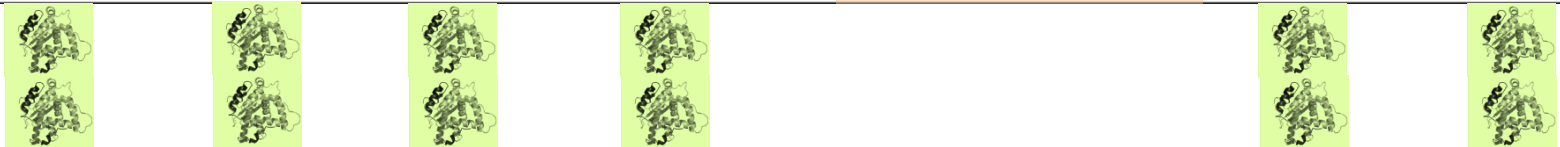
coding mutations



FKSI hot spot 1 mutation by position^a:

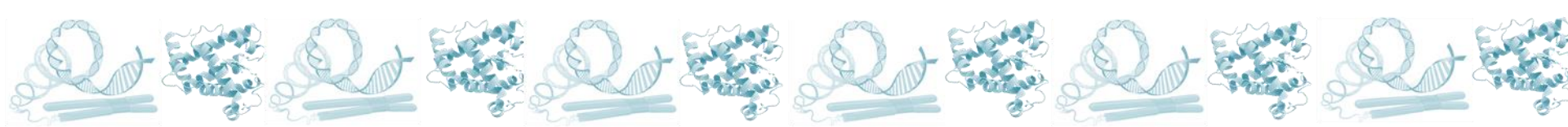
FKSI hot spot 2 mutation by position^a:

Isolate	1641 (A)	1653 (A)	1662 (T)	1929 (A)	1939 (A)	1946 (C)	4215 (C)	4230 (T)
S _{CL} 1130.04	A/T	A/G	T/C	T	A	C	C/T	T/C
952.04	A/T	A/G	T/C	T	A	C	C/T	T/C
5104.04	A/T	A/G	T/C	T	A	C	C/T	T/C
RR _{CL} 110.12	A/T	A/G	T/C	T	A/G	C/T	C/T	T/C
111.12	A/T	A/G	T/C	T	A/G	C/T	C/T	T/C
aa ^b	P547	T551	I554	T643	R647R/G ^c	P649P/L ^d	I1375	A1410

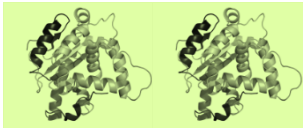
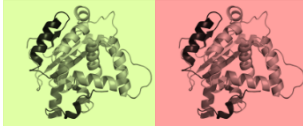
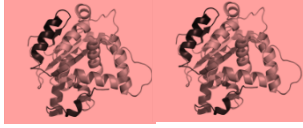


non-coding mutations

Die Isolate tragen zwei heterozygote Mutationen in der *FKS1* HS1.



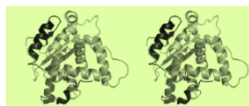
Welche Mutationen sind verantwortlich für die Resistenz? Unterschied homo- versus heterozygoter Mutationen?

Mutant isolates and QC	ANI	MICA	CAS		FKS		
SS _{WT} SC5314 ^c	0.015 (S)	≤0.008 (S)	0.19 (S)	}		WT	
RR _{MH2} ^c	0.06 (R)	0.03 (R)	0.75 (R)		}		heterozygot
RS _{MH1} ^c	0.015 (S)	0.03 (R)	0.25 (S)				homozygot
SR _{MH1} ^c	0.015 (S)	0.008 (S)	0.25 (S)				
RR _{MHO2} ^c	0.06 (R)	1 (R)	1 (R)				

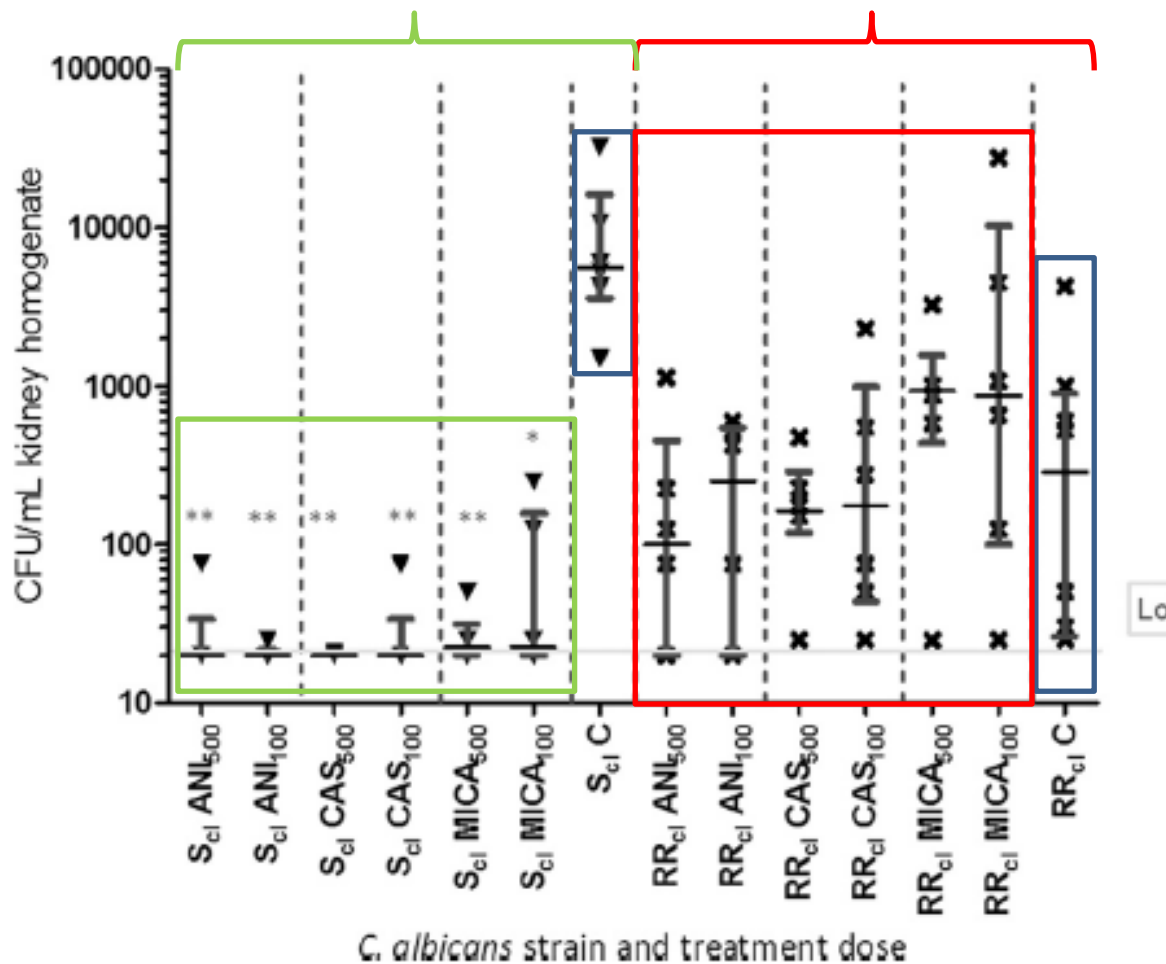
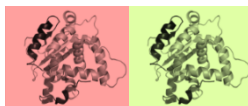
- Die Position und die Anzahl an Mutationen in der FKS ‚hot spot‘ Region beeinflussen die *in vitro* Resistenz von Isolaten entscheidend.
- Homozygote Mutationen führen zu einer viel höheren *in vitro* Resistenz als heterozygote Mutationen!

In vivo Therapieansprechen : AUC₁₀₀ versus AUC₅₀₀

WT



2xM

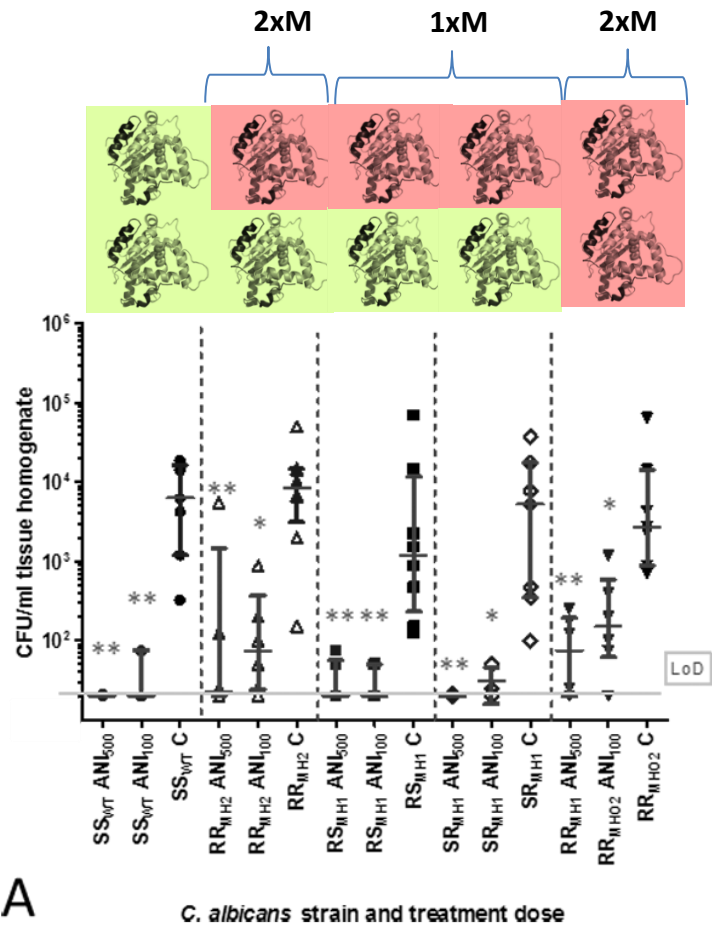


Bei dem klinischen Isolat kein verbessertes Ansprechen durch Dosis Eskalation !

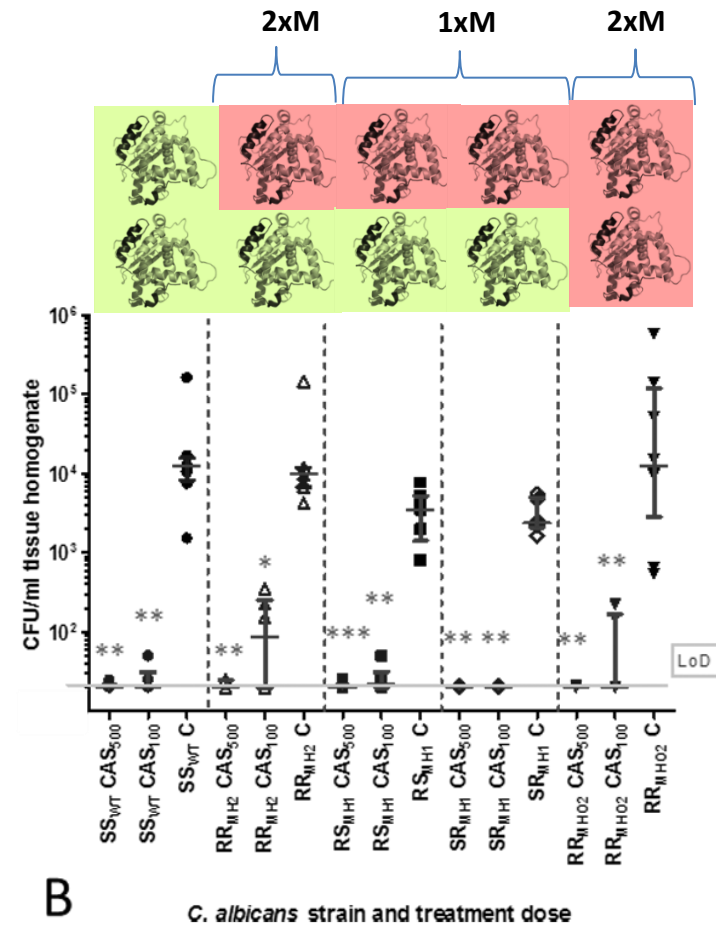
Klinische Isolate

Isogenetische Mutanten und deren Therapieansprechen bei AUC_{100} und AUC_{500}

Anidulafungin

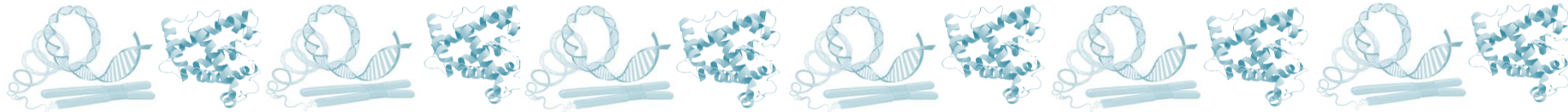


Caspofungin

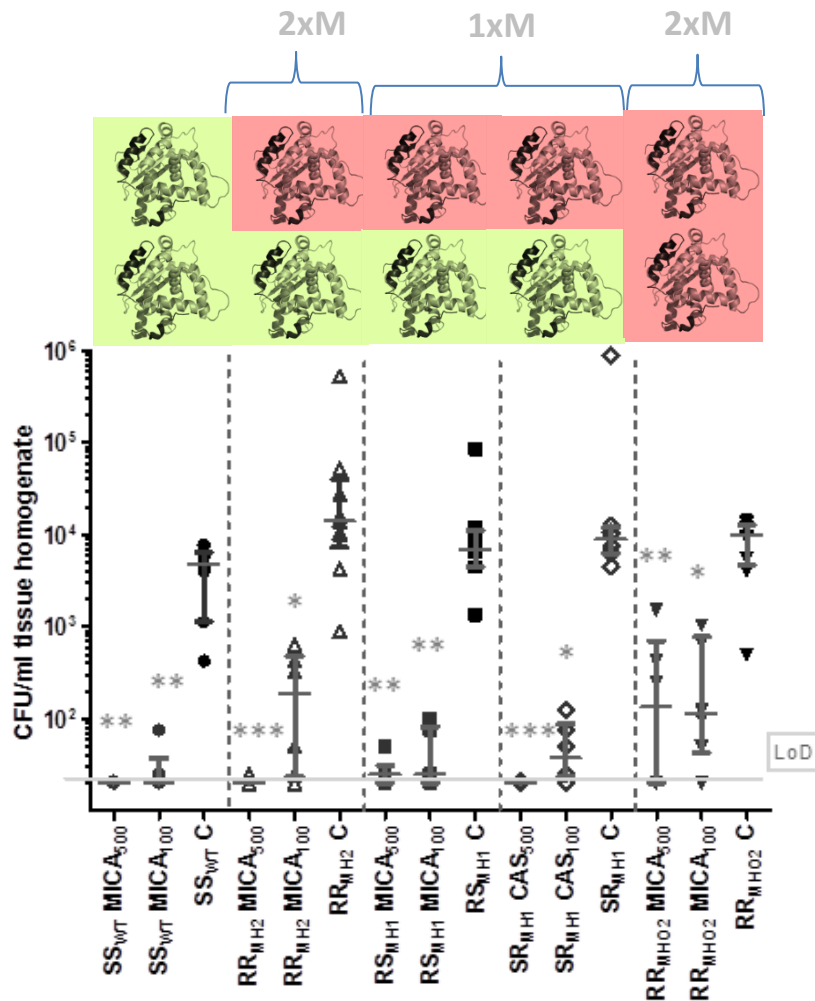


A

B



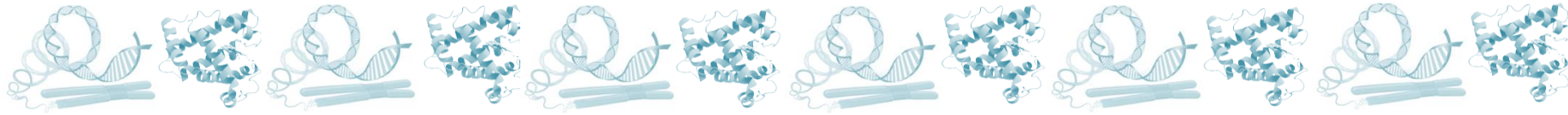
Micafungin



C

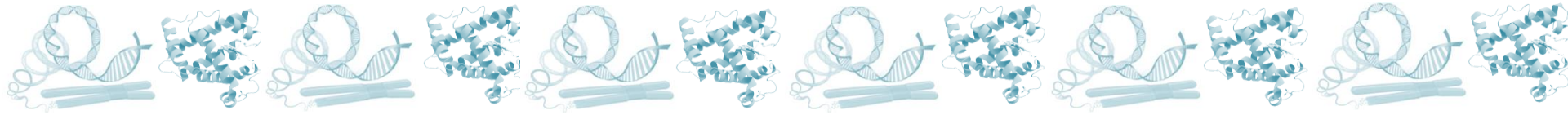
C. albicans strain and treatment dose

- Homozygote Mutationen führen zu einer erhöhten *in vivo* Resistenz
- Isolate mit einfachen und doppelten heterozygote Mutationen sprechen auf eine Dosiseskulation (AUC₅₀₀) an.
- Auch Isolate mit 2-facher simultaner heterozygoter Mutation sind empfindlich gegenüber erhöhten MICA Dosen.
- Isolate mit homozygoten Mutationen zeigen kein Therapieansprechen, auch nicht bei Dosiseskulation.



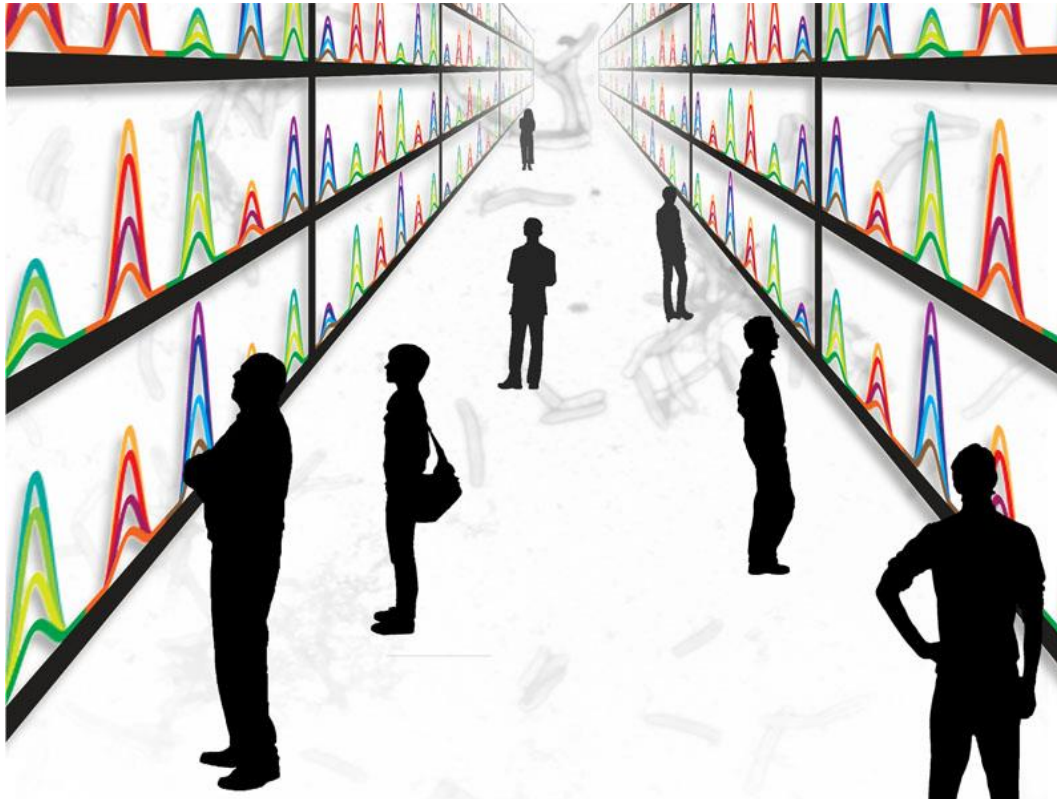
Schlussfolgerungen

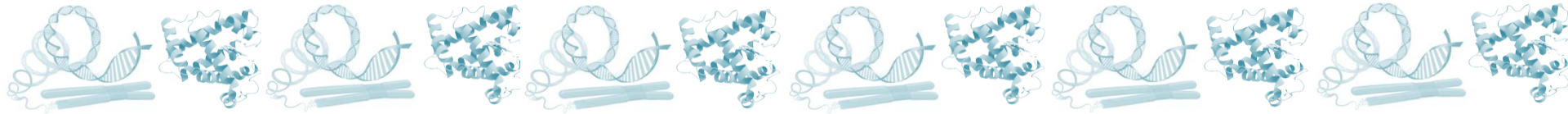
- Punktmutationen in den *FKS* HS Regionen erklären die Therapieresistenz der klinischen Isolate nicht zur Gänze
- Dosisescalation führt nicht zum Therapieerfolg bei klinischen Isolaten
- Dosisescalation führt zum Ansprechen bei Isolaten mit heterozygoter Einfachmutation
- Dosisescalation von Micafungin und Caspofungin führen zum Ansprechen bei Isolaten mit heterozygoter Doppelmutation (nicht jedoch Anidulafungin).
- Isolate mit homozygoten Doppelmutationen sind therapeutisch schwer zu kontrollieren, selbst mit Dosisescalation
- Unterschied im Ansprechen zwischen den unterschiedlichen Echinocandinen



Zukunftsperspektive

Genom und Proteom Vergleich zwischen den beiden klinischen Isolaten!





Danksagung

Karl Kuchler
Michael Tscherner
Fabian Istel



Martin Schaller

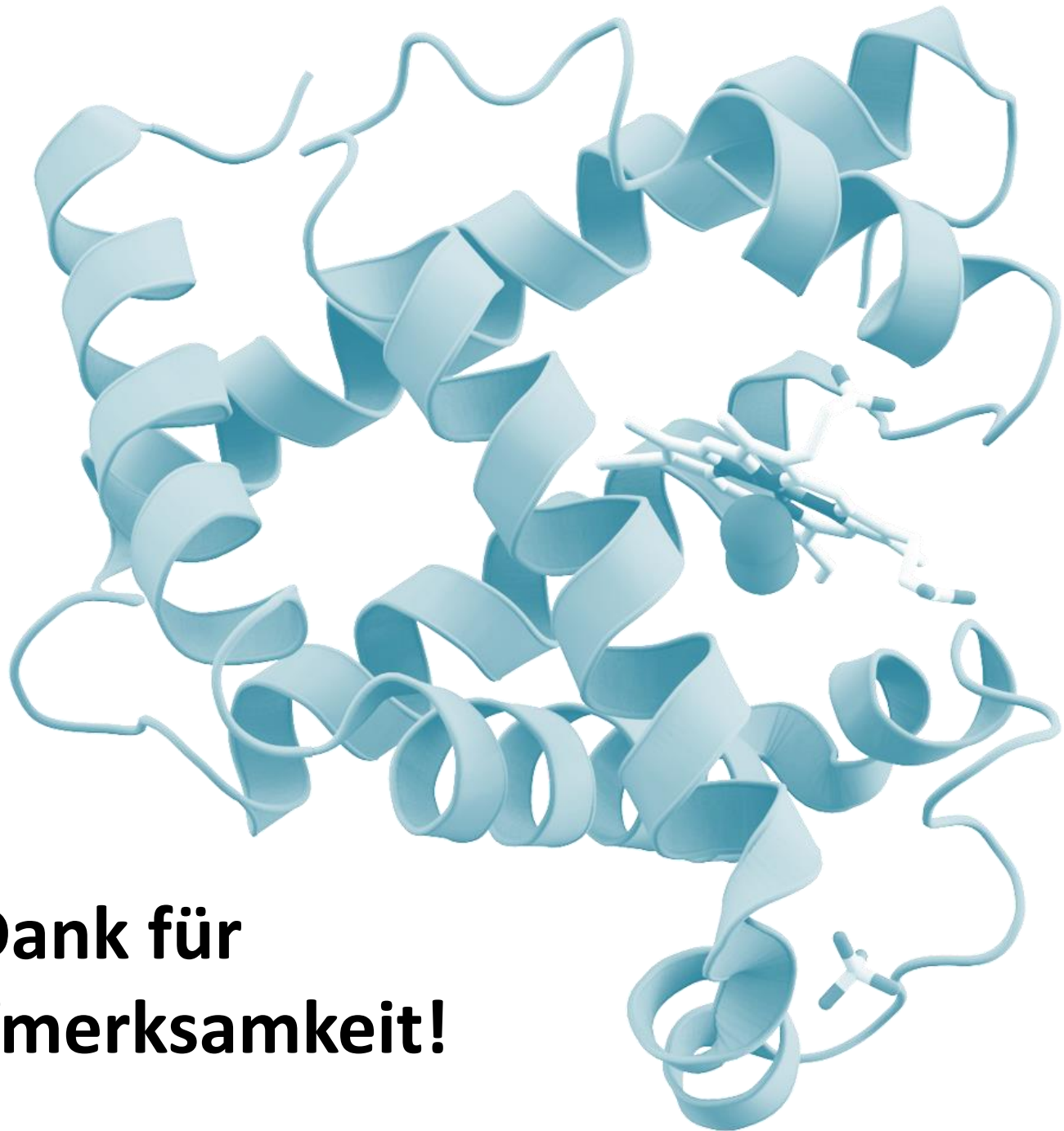


Maiken C. Arendrup



Cornelia Lass-Flörl
Bettina Sartori





**Vielen Dank für
Ihre Aufmerksamkeit!**