

# Molecular mechanisms of azole resistance in human pathogenic fungi

## Citation for published version (APA):

Marichal, P. (1999). *Molecular mechanisms of azole resistance in human pathogenic fungi*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990929pm>

## Document status and date:

Published: 01/01/1999

## DOI:

[10.26481/dis.19990929pm](https://doi.org/10.26481/dis.19990929pm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## **Samenvatting**

## *Samenvatting*

De laatste jaren is het aantal schimmelinfecties toegenomen, vooral door het stijgende aantal patiënten met een sterk verzwakt immuunsysteem. Deze patiënten blijken drager te zijn van een grote verscheidenheid aan kiemen. Medicatie om deze infecties te bestrijden is beperkt tot slechts een paar klassen van antifungale producten, waarvan de azolen veruit het meest toegepast worden. Azolen remmen de ergosterolbiosynthese in schimmels. De combinatie van het verdwijnen van ergosterol, nodig voor efficiënte celdeling, met een ophoping van metabole voorlopers verstoort de cel zodanig dat dit resulteert in een remming van de groei. Net zoals bij bacteriën en andere micro-organismen treedt er echter ook resistentie op. Het falen van een therapie met antimycotische producten bij patiënten kan verscheidene oorzaken hebben. Een aantal factoren zijn gerelateerd aan de patiënt, andere zijn dan afhankelijk van het gekozen antifungaal product en daarnaast zijn er ook factoren die gerelateerd zijn aan de infecterende kiem zelf. Voorbeelden van factoren die afhankelijk zijn van de patiënt zijn de status van het immuunsysteem, de therapietrouw en afwijkende farmacokinetiek. Biochemisch kan men drie grote systemen onderscheiden van resistentiemechanismen. In het eerste systeem verhindert een groep van factoren dat er voldoende actieve inhibitoren ter hoogte van het doel komen ofwel door een defect in de opname ofwel door het terug naar buiten werken van de inhibitor door energieafhankelijke pompen. Er zijn twee typen van pompen: enerzijds deze die een ATP-bindende cassette bevatten (ABC-type) en die ATP verbruiken, en anderzijds de pompen die als bron van energie gebruik maken van de protongradient (MFS-type, "Major Facilitator superfamilie"). Een tweede systeem houdt verband met de veranderingen van het doelwit. Deze verandering kan bijvoorbeeld een verhoogde concentratie zijn of een structurele verandering die de affiniteit van de inhibitor voor het doeleiwit vermindert. Een derde systeem is het wegwerken van de groeiremmende effecten van de azolen. Inderdaad, als de cel onafhankelijk wordt van de aanwezigheid van ergosterol, of als de cel de storende precursoren kan elimineren, omzeilt de cel de gevolgen van de azolgeïnduceerde inhibitie ter hoogte van de sterolbiosynthese. Het doel van deze studie was om meer inzicht te verwerven in de verschillende resistentiemechanismen aan de hand van biochemische analyse van klinische isolaten behorende tot verschillende species van humane pathogene fungi.

Finaal wordt beoogd om deze kennis toe te passen tijdens het zoek- en selectieproces van nieuwe antifungale producten. Uit de opgedane ervaring destilleert men richtlijnen om klinische resistentie biochemisch te benaderen.

In hoofdstuk 2 wordt het voorkomen van en de bijdrage tot de resistentie van puntmutaties in het cytochroom P450 14a-demethylase (Erg11p) onderzocht via biochemische technieken of via computermodellen. De sequentieanalyse van het *ERG11*-gen van 7 isolaten resulteerde in 12 aminozuursubstituties, waarvan er zes tot dan niet beschreven waren. Daarenboven werden er nog 16 verschillende stille mutaties gevonden. Twee biochemische technieken werden gebruikt om de affiniteit van het cytochroom P450 voor fluconazol en itraconazol na te gaan. Vier isolaten hadden een verminderde binding met itraconazol. Vijf isolaten vertoonden een meer uitgesproken daling in affiniteit voor fluconazol. Computermodellen werden gebruikt om alle gerapporteerde substituties (29 in aantal) te positioneren. De substituties clusterden in drie regio's. In de eerste twee regio's was alleen de Y132H-substitutie aantoonbaar van belang, terwijl de drie andere belangrijke mutaties terug te vinden zijn in het C-terminale gedeelte. In hoofdstuk 3 werd de ergosterolbiosynthese en de gevoeligheid voor azolen geanalyseerd in een set van 16 klinische *C. albicans*-isolaten afkomstig van vijf patiënten. De resistente isolaten van de tweede patiënt vertoonden in controleomstandigheden reeds een abnormaal sterolprofiel en werden daarom uitgekozen voor verder gedetailleerd onderzoek. Na azolbehandeling werd er in deze isolaten een stapeling gevonden van 3-ketosteroiden, wat er op wijst dat azolen in deze *C. albicans*-cellen ook interfereren met de 3-ketoreductasestap van het 4-demethylatieproces. De stapeling van deze toxische 3-ketosteroiden correleerde met een verminderde uitgroei ten opzichte van isolaten waar dit niet het geval was. Er werden geen mutaties gevonden in het *ERG25*-gen, dat deel uitmaakt van het 4-demethylatieproces. De juiste moleculaire basis voor de opstapeling blijft tot op heden ongekend.

In hoofdstuk vier wordt via itraconazol-accumulatiemetingen aangetoond dat de expressie van *CDRI*, een ABC-type transporter, invloed heeft op de cellulaire inhoud van dit lipofiel azol. De expressie van *CaMDR*, een MFS-type transporter, had daarentegen geen invloed. Dit werd zowel aangetoond met klinische isolaten, die de desbetreffende pomp tot expressie brengen als met heterologe

## Samenvatting

expressie van deze pompen in *Saccharomyces*. Voor fluconazol, werd bevestigd dat dit hydrofiel azol wel door beide pompen als substraat herkend wordt. Tacrolimus en  $\text{NaN}_3$  zijn in staat om de *CDRI*-gerelateerde vermindering in cellulaire inhoud van itraconazol op te heffen. De combinatie van tacrolimus en itraconazol werkt synergistisch op de groei van azolresistente *C. albicans*.

Voor de azolresistente *Candida glabrata*-stam beschreven in hoofdstuk 5 werd aangetoond dat de aanwezigheid van meerdere kopieën van het chromosoom dat het cytochroom P450-gen bevat aan de basis ligt van de resistentie. Als gevolg van deze multiplicatie, die niet aanwezig was in de gevoelige moederstam, werd een verhoogde transcriptie van het gen gemeten wat resulteerde in een verhoogde enzymeconcentratie en activiteit. Via 2D-gel-elektroforese werd aangetoond dat de aanwezigheid van meerdere kopieën van dit chromosoom resulteerde in een verhoogde vorming van niet minder dan 25 eiwitten en een sterk verlaagde concentratie van 75 eiwitten. Door herhaalde kweek op een azolvrij medium, verdween de multiplicatie geleidelijk en verliep dit parallel met het terugkeren van de gevoeligheid en de terugkeer naar een 2D-profiel dat gelijk is op dat van de moederstam.

In hoofdstuk 6 wordt aangetoond dat itraconazol naast de 14-demethylatiereactie ook interfereert met de 3-ketoreductase in *Cryptococcus neoformans*. Deze interferenties leidden ertoe dat er substantiële hoeveelheden obtusifolione, een 3-ketosteroïde, zich opstapelen. Vermits dit een toxisch tussenproduct is, kan dit de sterke groei-inhibitie van itraconazol in dit species verklaren.

Hoofdstuk 7 handelt over *Candida krusei*, een species dat als intrinsiek fluconazolresistent wordt beschreven. Andere azolen omvatten dit species wel in hun spectrum. Via sterolsynthese-experimenten, zowel in intacte cellen als in subcellulaire fracties, en via accumulatieproeven werd aangetoond dat voor fluconazol in deze stammen zeer lage cellulaire concentraties bereikt worden, wat wellicht gedeeltelijk aan de basis ligt van de intrinsieke resistentie.

Twee clonaal gerelateerde stammen van *Histoplasma capsulatum*, een moederstam geïsoleerd voor behandeling en een "relapse"-isolaaat, geïsoleerd uit dezelfde patiënt na fluconazolbehandeling, werden *in vitro* vergeleken voor wat betreft groei-gevoeligheid en sterolsynthese t.o.v. twee azolen, itraconazol en fluconazol. De "relapse"-stam vertoonde een verminderde gevoeligheid voor flu-

conazol zowel wat betreft groei als sterolsynthese. Itraconazol daarentegen was zelfs actiever tegen deze “relapse”-stam, zodat deze stammen een negatieve kruisresistentie vertonen voor itraconazol t.o.v. fluconazol.

De selectie van isolaten voor biochemische studies gebeurt voornamelijk op basis van een verhoogde MIC-waarde. Vermits MIC-waarden sterk afhangen van de experimentele omstandigheden, heeft de antifungale NCCLS-deelgroep een referentiemethode beschreven die toelaat op reproduceerbare wijze de gevoeligheid van species te bepalen. Helaas is er geen absolute correlatie tussen MIC-waarden en de voorspelling van klinisch resultaten. Tien percent van de patiënten gekoloniseerd in de mond of luchtpijp met isolaten met een lage MIC-waarde reageren onvoldoende op de behandeling. Waarschijnlijk dragen hier andere factoren bij tot de mislukking van de behandeling. De therapie van patiënten waarbij isolaten gevonden werden met hoge MIC-waarden heeft toch nog een slaagkans van 50%. Mogelijke redenen van deze discrepantie zijn, dat de patiënt gekoloniseerd is door meerdere isolaten en het isolaat met een hoge MIC-waarde nauwelijks of niet bijdraagt tot de klinische symptomen, of dat er synergisme bestaat tussen de antifungale behandeling en een of meer gastheerfactoren of, dat gedeeltelijke groeiremming reeds voldoende is om de balans tussen kolonisatie en uitroeiing in het voordeel van de patiënt te laten overhellen. Uit de gedane studies kan men besluiten dat er in klinisch resistente isolaten meestal een combinatie van meerdere resistentiemechanismen tegelijkertijd aanwezig zijn. De aanwezigheid van slechts één type van resistentie geeft waarschijnlijk voor de cellen met deze eigenschap al wel een concurrentieel voordeel, zodat ze onder blijvende selectiedruk een groot deel van de populatie gaan uitmaken. Volgens deze hypothese is het echter onwaarschijnlijk dat alle koloniserende cellen identiek dezelfde eigenschappen hebben, wat voor biochemisch onderzoek het noodzakelijk maakt om meerdere isolaten parallel te onderzoeken. De interpretatie van biochemische analyses is het eenvoudigst wanneer de clonaal gerelateerde moedercel ook ter beschikking is.