

**Das lysosomale Kompartiment als Ansatzpunkt
für therapeutische Anwendungen**

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Anja S. Apel, geb. Hobler

aus Mangalore (Indien)

vorgelegte

Dissertation

2006

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft Tübingen (AG Prof. Dr. A. Mayer)

in Kooperation mit der Sektion Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung des Universitätsklinikums Tübingen (AG Prof. Dr. H. P. Rodemann) in der Zeit von Juli 2002 bis Mai 2006 angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2006

Dekan: Prof. Dr. Friedrich Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Peter Rodemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alfred Nordheim

VORWORT

Am Ende eines langen und intensiven Forschungsprojektes angekommen, bleibt mir, den Menschen zu danken, die am Zustandekommen und der Durchführung dieser Arbeit ihren Anteil hatten. Zuvorderst danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Mayer für die Bereitstellung des Themas, Herrn Prof. Dr. H. Peter Rodemann für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Betreuung des zweiten Teils dieser Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens, sowie Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass es mir ermöglicht wurde, diese Arbeit trotz des Umzugs der Arbeitsgruppe Andreas Mayers nach Lausanne in Tübingen zu Ende bringen zu können.

Zu besonderem Dank bin ich Dr. Oliver Müller verpflichtet für seine Einführung in die Promotionsarbeit, die Betreuung des ersten Teils dieser Arbeit sowie seine stete Unterstützung und Hilfe über die gesamte Zeit. Christa Baradoy und Katja Krüger danke ich für viele hilfreiche Handgriffe. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Heinz Schwarz, Ursel Müller und Brigitte Sailer für die Einführung und ihre Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie. Außerdem danke ich Prof. Dr. Anne Spang samt ihrer Arbeitsgruppe für die unkomplizierte Mitbenutzung des Fluoreszenzmikroskops und des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Schließlich danke ich den Labormitgliedern beider Arbeitsgruppen, insbesondere Dr. Claudia Dangelmayr, Dr. Christopher Peters, Sonja Nolte, Guido Krebiehl und Dominika Schmid-Bielenberg, für all die angenehmen Stunden im Labor.

Rückhalt gab mir während der Zeit dieser Arbeit nicht zuletzt meine Familie, besonders meine Mutter, für deren aufmunternde Worte ich mich herzlich bedanke. Vor allem danke ich meinem geliebten Mann Kim Apel für seine großartige Unterstützung, seine Geduld bei allen Vorträgen und sein Verständnis für die vielen langen Abende und die unzähligen Wochenenden und Feiertage, die ich im Labor verbringen musste.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	10
1.1 Das lysosomale Kompartiment	10
1.1.1 Das lysosomale Kompartiment bei Tier und Mensch: das Lysosom	10
1.1.2 Das lysosomale Kompartiment bei Pflanze und Pilz: die Vakuole	11
1.1.3 Das Lysosom bzw. die Vakuole als Ansatzpunkt für die Therapie	11
1.2 Die Vakuole bei <i>Candida albicans</i>	12
1.2.1 <i>Candida albicans</i> ist ein pathogener Pilz	12
1.2.2 Virulenzfaktoren in <i>Candida albicans</i>	13
1.2.2.1 Wachstum	13
1.2.2.2 Erkennung des Wirts und Adhäsion	14
1.2.2.3 Enzyme	14
1.2.2.4 Morphologie	15
1.2.2.5 Immunmodulation	16
1.2.3 Vakuolenfunktion, Vakuolenmorphologie und Virulenz	16
1.2.4 Hyphenbildung und Virulenz	18
1.2.5 Gendeletionen in <i>Candida albicans</i>	19
1.2.6 Test der Virulenz von <i>Candida albicans</i>	20
1.2.7 Membranfusion der Vakuole und die zehn vakuolären Kandidatengene	20
1.3 Autophagie bei Tumorzellen	22
1.3.1 Autophagie Allgemein	22
1.3.2 Funktion der Autophagie	22
1.3.3 Autophagie physiologisch/pathophysiologisch	24
1.3.4 Autophagie und Tumorentstehung	25
1.3.5 Molekulare Signalwege und die autophagischen Kandidatengene	27
1.3.5.1 Beclin1p	30
1.3.5.2 Apg3p	30
1.3.5.3 Apg4p	31
1.3.5.4 Apg5p	31
1.3.5.5 Apg12p	32
1.3.6 RNAi als Technik zur Geninhibition	32
1.4 Zielsetzung	33

2	MATERIAL UND METHODEN	34
2.1	Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen	34
2.2	Versuche mit <i>Candida albicans</i>	37
2.2.1	Stämme und Wachstumsbedingungen	37
2.2.2	Herstellung der Deletionskassetten	38
2.2.3	Hefe-Transformation mittels Elektroporation	44
2.2.4	Isolierung chromosomaler DNA	44
2.2.5	Restriktionsverdau	45
2.2.6	Southern Blot	46
2.2.7	Färbung der Vakuolenmembran	46
2.2.8	Induktion der Hyphenbildung	47
2.2.9	Virulenzstudien <i>in vivo</i>	47
2.3	Versuche mit Tumorzellen	48
2.3.1	Zelllinien und Wachstumsbedingungen	48
2.3.2	Transfektion mit siRNA	49
2.3.3	Bestrahlung	50
2.3.4	RNA-Isolation	51
2.3.5	OneStep RT-PCR	51
2.3.6	LightCycler®-PCR	52
2.3.7	Protein-Isolation und Western Blot	53
2.3.8	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	55
2.3.9	Färbung autophagischer Vesikel mit <i>GFP-LC3</i> -Plasmid	55
2.3.10	Positivkontrollen für Autophagie (Vinblastinsulfat und Rapamycin)	57
2.3.11	Koloniebildungstest: Überlebenstest für Tumorzellen nach Bestrahlung	58
3	ERGEBNISSE	59
3.1	Ergebnisse: Vakuolenfunktion bei <i>Candida albicans</i>	59
3.1.1	Identifikation der zehn vakuolären Kandidatengene im <i>Candida albicans</i> -Genom	59
3.1.2	Herstellung der Deletionsmutanten am Beispiel von <i>CaVAM3</i>	60
3.1.3	Vakuoläre Morphologie der <i>Candida albicans</i> -Nullmutanten	67
3.1.4	Virulenz der heterozygoten und homozygoten <i>Candida</i> -Mutanten <i>in vivo</i>	70
3.1.5	Induktion der Hyphenbildung	74
3.2	Ergebnisse: Autophagie bei Tumorzellen	78
3.2.1	Senkung der mRNA-Expression durch siGENOME SMARTpool -Reagenzien	78
3.2.2	Dauer der Transfektionswirkung auf RNA-Level	79
3.2.3	Auswirkung von Bestrahlung auf die mRNA-Expression der Autophagie-Gene	80
3.2.4	Senkung der Proteinexpression durch siGENOME SMARTpool <i>BECLIN1</i> -siRNA	84
3.2.5	Dauer der Transfektionswirkung auf Protein-Level	85
3.2.6	Auswirkung von Bestrahlung auf die Beclin1-Proteinexpression	87

3.2.7	Zeitliche Induktion der Vesikelbildung nach Bestrahlung in den vier Zelllinien (TEM)	90
3.2.8	Induktion der Vesikelbildung nach verschiedenen Bestrahlungsdosen (TEM)	92
3.2.9	Positivkontrollen im Elektronenmikroskop (Vinblastinsulfat, Rapamycin)	93
3.2.10	Hemmung der Autophagie-Induktion durch siRNA in MDA-MB-231 (TEM)	94
3.2.11	Hemmung der Autophagie-Induktion durch siRNA in HTB43 (TEM)	96
3.2.12	Vesikelbildung in den verschiedenen Zelllinien (FM)	97
3.2.13	Positivkontrollen im Fluoreszenzmikroskop (Vinblastinsulfat, Rapamycin)	99
3.2.14	Induktion der Vesikelbildung nach verschiedenen Bestrahlungsdosen (FM)	99
3.2.15	Zeitliche Induktion der Vesikelbildung nach Bestrahlung (FM)	100
3.2.16	Co-Transfektion von <i>GFP-LC3</i> und si <i>GLO</i> RISC-free siRNA (FM)	101
3.2.17	Hemmung der Autophagie-Induktion durch siRNA in MDA-MB-231 (FM)	102
3.2.18	Koloniebildungstest	105
3.2.19	Zeitpunkt für den Koloniebildungstest nach der Transfektion	106
3.2.20	Dosis-Wirkungskurven mit Einzeldosis-Bestrahlung	107
3.2.21	Dosis-Wirkungskurve mit fraktionierter Bestrahlung	110
4	<i>DISKUSSION</i>	114
4.1	Diskussion: Vakuolenfunktion bei <i>Candida albicans</i>	114
4.1.1	Die zehn vakuolären Kandidatengene	114
4.1.2	Vakuolenmorphologie, Vakuolenfunktion und Hyphenwachstum	115
4.1.3	<i>CaVAM3</i>	117
4.1.4	<i>CaYPT7</i>	118
4.1.5	<i>CaYPT7</i> als Virulenzfaktor	119
4.2	Diskussion: Autophagie bei Tumorzellen	120
4.2.1	Gen-Inhibition durch siRNA und ihr Einsatz in der Therapie	120
4.2.2	Autophagie-Induktion nach Bestrahlung	121
4.2.3	RNAi-Effekte auf die Strahleninduktion autophagischer Vesikel	122
4.2.4	RNAi-Effekte auf das zelluläre Überleben	123
4.2.5	Autophagie als Ansatzpunkt für die Tumorthherapie	124
5	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	126
6	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	129
7	<i>LEBENS LAUF</i>	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMBA	Acrylamid/Bisacrylamid
APG-Gene	<u>AutoPhaGy</u> , Autophagie-Gene, die bei einem Screen nach Hefestämmen mit Nährstoffmangel-Sensitivität entdeckt wurden (Tsukada & Ohsumi, 1993)
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
d	Day (Tag)
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E1-Enzym	Ubiquitin-Aktivierungsenzym
E2-Enzym	Ubiquitin-Konjugationsenzym
E3-Enzym	Ubiquitin-Ligationsenzym
ECL	Enhanced chemiluminescence (Detektionssystem für Western Blot)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum), hitzeinaktiviert
<i>FLP</i> -Rekombinase	Enzym zur intrachromosomalen Rekombination
FM	Fluoreszenzmikroskop
FM ⁴⁻⁶⁴	(<i>N</i> -(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (Fluoreszenzfarbstoff zur Membran- und Vakuolenfärbung)
<i>FRT</i> -Sequenz	Sequenz, die nach Exzision der <i>URA3</i> -Flipper-Kassette im Genom verbleibt
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein (Fluoreszenzmarker)
GFP-LC3p	Fusionsprotein aus Green fluorescent protein und Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (spezifisches Markerprotein für Autophagosomen zur Fluoreszenzmikroskopie)
Gy	Gray
h	Hour (Stunde)
HC-Medium	Hartwell`s Complete
H ₂ O bidest.	Bidestilliertes Wasser
H ₂ O deion.	Deionisiertes Wasser
IgG	Immunglobulin G (Antikörper)
kDa	Kilo Dalton

LB-Medium	Lennox-Medium
LC3p	Abkürzung für Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1-LC3)
<i>MAP1-LC3</i>	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
MCS	multiple cloning site (Klonierungsstelle)
min	Minute (Minute)
mRNA	messenger RNA
mut.	mutiert
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
orf	open reading frame (offenes Leseraster)
PCD	Programmed cell death (Programmierter Zelltod)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Plating efficiency (Anwachsrate)
<i>PI3-K</i>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[ethansulfonsäure]
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
RISC	RNA induced silencing complex (cytoplasmatischer Protein-RNA-Komplex)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA interference (post-transkriptionale sequenzspezifische mRNA-Expressionshemmung mittels doppelsträngiger kleiner RNAs)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transkription-Polymerase chain reaction (Umschreibung von RNA in cDNA)
s	Second (Sekunde)
<i>SAP2</i> -Promoter	induzierbarer Promoter der <i>FLP</i> -Rekombinase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF	Survival fraction (Überlebensrate)
siRNA	small interfering RNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tr.	Transfektion
üN	über Nacht

<i>URA3</i>	auxotropher Selektionsmarker
UTR	untranslated region (untranslatierte Region)
VBL	Vinblastinsulfat
wt.	Wildtyp
YNB	Yeast-Nitrogen-Base
YPD-Medium	Hefemedium aus Yeast-Extrakt, Polypepton und Glucose (Dextrose)

1 EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung des lysosomalen Kompartiments als Zielstruktur für pathophysiologische Prozesse wie Pilz-Infektionen und Tumorerkrankungen untersucht. Beispielhaft wird an dem pathogenen Hefepilz *Candida albicans* und an humanen Tumorzelllinien aufgezeigt, inwiefern die Hemmung des lysosomalen Kompartiments Ziel einer hier ansetzenden Therapie sein kann (Drug target). Die Target validation wird im Fall des Hefepilzes durch das Mausmodell der systemischen Candidosis, im Fall der Tumorzellen durch ionisierende Bestrahlung durchgeführt.

1.1 Das lysosomale Kompartiment

1.1.1 Das lysosomale Kompartiment bei Tier und Mensch: das Lysosom

Lysosomen wurden 1955 erstmals von dem Belgier Christian De Duve als zentrale Organellen für intrazellulären Abbau beschrieben. Sie wurden durch subzelluläre Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation entdeckt. 1974 bekam De Duve für diese Entdeckung den Medizin-Nobelpreis verliehen (De Duve, 1959) (Luzio *et al.*, 2000) (Kroemer & Jäättelä, 2005).

Lysosomen sind membranumhüllte Kompartimente, die mit Hydrolasen für den kontrollierten intrazellulären Verdau angefüllt sind. Lysosomaler Abbau ist wichtig für physiologische Prozesse wie z.B. den Umsatz normaler Zellproteine, den Abbau intra- und extrazellulärer Abfälle, die Entfernung abnormer Proteine, die Senkung der Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren, die Reparatur der Plasmamembran, die Freisetzung endozytierter Nährstoffe, die Metallionen-Homöostase, die Inaktivierung phagozytierter pathogener Mikroorganismen und die Antigen-Prozessierung (Mullins & Bonifacino, 2001). Lysosomen enthalten ca. 50 verschiedene saure Hydrolasen, darunter Proteasen, Peptidasen, Nukleasen, Glykosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Phosphatasen und Sulfatasen. Mit Hilfe einer ATP-getriebenen Protonenpumpe wird im Lumen ein pH von 5,1-5,5 aufrechterhalten (Cytosol: pH 7,2), bei dem die Hydrolasen ihr Aktivitätsoptimum haben. Durch Transportproteine in der Lysosomenmembran werden die Abbauprodukte (Aminosäuren, Zucker, Nukleotide und Fettsäuren) zur Verwertung ins Cytosol abgegeben. Die meisten lysosomalen Membranproteine wie Lamps (lysosome-associated membrane proteins), Limps (lysosome-integrated membrane proteins) und Lgps (lysosomal membrane glycoproteins) sind stark glykosyliert (N-gebundenes Oligosaccharid Mannose-6-Phosphat), um sie gegen die lysosomalen Proteasen im Lumen zu schützen (Anderson & Orci, 1988) (Holtzman, 1989) (Mullins & Bonifacino, 2001) (Alberts *et al.*, 2004) (Kroemer & Jäättelä, 2005).

1.1.2 Das lysosomale Kompartiment bei Pflanze und Pilz: die Vakuole

Dem Lysosom bei Tier und Mensch entspricht die Vakuole bei Pflanze und Pilz. Die meisten Pflanzen- und Pilzzellen (einschließlich Hefen) enthalten eine oder mehrere sehr große, flüssigkeitsgefüllte saure Vesikel, die sog. Vakuolen. Sie nehmen meist mehr als 30 % des Zellvolumens ein, in manchen Fällen bis zu 90 %. Vakuolen enthalten ebenfalls eine Vielzahl an Hydrolasen (Saure Phosphatasen, Peptidasen, Nukleasen, Lipasen, Glucanasen). Jedoch sind die Funktionen der Vakuole noch vielfältiger als die des Lysosoms bei höheren Eukaryoten. Die Vakuole kann als Speicherorganell sowohl für Nährstoffe als auch für Abfallstoffe dienen, als Kompartiment für den Abbau, als ökonomisch günstige Möglichkeit zur Vergrößerung des Zellvolumens und als Regulator des Turgordrucks. Die Vakuole ist ein wichtiges homöostatisches Werkzeug, z.B. für den pH, den Turgor sowie für den kontrollierten Abbau von Polymeren und dient gleichzeitig als Quelle der Bausteine für deren Resynthese (Alberts *et al.*, 2004) (Thompson & Vierstra, 2005).

1.1.3 Das Lysosom bzw. die Vakuole als Ansatzpunkt für die Therapie

Da die beschriebenen Funktionen von Vakuole bzw. Lysosom gehemmt werden können, stellen diese Zielstrukturen für eine Therapie dar. Anhand von *Candida albicans* und humanen Tumorzellen soll dies wie schon angedeutet untersucht werden.

Bei pathogenen Hefespezies spielt die Vakuole über ihre sonstigen Funktionen wie Abbau, Speicherung, Homöostase und Detoxifikation hinaus zusätzlich eine Schlüsselrolle bei der Anpassung des Pilzes an verschiedene Umwelten im Wirt. Zudem wird die Vakuole für zelluläre Differenzierungsprozesse wie den Yeast-to-Hyphae-Übergang benötigt, der dem Pilz die Möglichkeit gibt, rasch seine Umwelt zu erkunden. Somit ist die Vakuolenfunktion über die Yeast-to-Hyphae-Morphogenese mit der Virulenz pathogener Hefepilze verbunden (Bruckmann *et al.*, 2000) (Bruckmann *et al.*, 2001) (Palmer *et al.*, 2003) (Eck *et al.*, 2005) (Poltermann *et al.*, 2005). Hier setzt die Untersuchung an.

Autophagie ist die generelle Bezeichnung für intrazelluläre Prozesse, bei denen cytosolische Komponenten innerhalb Lysosomen mit Hilfe lysosomaler Enzyme degradiert werden. Die Hauptaufgabe der Autophagie ist wie schon gesagt die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Da Autophagie das Überleben bei Stress fördert, ist sie in die Tumorentstehung und -progression involviert und stellt daher einen geeigneten Ansatzpunkt für eine mögliche Therapie dar (Meijer & Codogno, 2004) (Cuervo, 2004) (Levine & Klionsky, 2004) (Levine & Yuan, 2005).

1.2 Die Vakuole bei *Candida albicans*

1.2.1 *Candida albicans* ist ein pathogener Pilz

Candida albicans ist einer der wichtigsten opportunistischen Krankheitserreger im Menschen. Der Pilz lebt normalerweise kommensalisch in der Flora des menschlichen Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts sowie auf der Haut. Die Fähigkeit, in zahlreichen anatomisch und physiologisch unterschiedlichen Bereichen wie den Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts, auf der Haut und im Blutstrom überleben zu können, ist entscheidend für seine Vielseitigkeit (Calderone & Fonzi, 2001) (van Burik & Magee, 2001).

Opportunistische Erreger rufen eine Erkrankung hervor, wenn das Immunsystem des Wirts lokal, systemisch oder aufgrund einer angeborenen Dysfunktion beeinträchtigt oder geschädigt ist. Da der Pilz in Zeiten eines funktionstüchtigen Immunsystems kommensalisch ist, befindet er sich bereits am richtigen Ort, um kontinuierlich zu wachsen, sobald die körpereigene Abwehr nachlässt. Dieses unregulierte Wachstum und die Produktion von Virulenzfaktoren führen schließlich zur invasiven Infektion (van Burik & Magee, 2001).

Immunkompetente Patienten haben oft mit oberflächlichen *Candida*-Infektionen zu kämpfen. Patienten mit geschwächtem Immunsystem sind zusätzlich besonders anfällig für systemische *Candida*-Infektionen. Sobald der Krankheitserreger in den Blutstrom gelangt (Candidämie), kommt es zur Invasion des Wirtsgewebes und in Folge zum Wachstum von Pilzen in Organen wie Niere, Leber, Milz, Herz, Lungen, Gehirn oder Auge (Mendelson, 2001) (Berman & Sudbery, 2002). Die Immunschwäche kann z.B. von einer AIDS-Erkrankung, von einer Immunsuppression nach Organtransplantation oder von einer Chemo- bzw. Strahlentherapie bei Tumorerkrankungen herrühren. Ebenfalls nachteilig sind Implantate jeglicher Art und eine Antibiotikabehandlung, welche die normale bakterielle Darmflora schädigt bzw. eliminiert. Neugeborene besitzen noch kein voll funktionsfähiges Immunsystem, ebenso Diabetiker und Leukämiekranken aufgrund einer Neutrophilen-/Monocyten-Dysfunktion. Schwangere weisen aufgrund eines veränderten Hormonspiegels eine erhöhte Anfälligkeit auf (Mendelson, 2001) (van Burik & Magee, 2001) (Willis *et al.*, 2001) (Berman & Sudbery, 2002) (Douglas, 2003).

Candidosis ist eine Infektion, welche die Haut, die Schleimhäute des Mundes, des Rachens, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts, sowie das Gefäßsystem befallen kann. Die Häufigkeit der Candidosis macht sie zu einer sehr wichtigen Krankheit: *Candida albicans*-Infektionen sind in ihrer Häufigkeit weltweit auf Platz vier (nach Gram-negativen Staphylococci, *Staphylococcus aureus* und Enterococci) und sie sind die häufigste Krankenhaus-Infektion.

Die Sterblichkeit bei erkrankten Patienten beträgt 35-40 % und die Behandlungskosten sind immens.

Der Pilz *Candida albicans* ist genau wie menschliche Zellen eukaryotisch und somit sind die meisten biologischen Prozesse sehr ähnlich wie im menschlichen Wirt. Daher verursachen die meisten Pilz-Medikamente schwere Nebenwirkungen, und können oft nur in Dosen eingesetzt werden, in denen sie eher fungistatisch als fungizid wirken. Deshalb ist es ein wichtiges Ziel der *Candida*-Forschung, geeignete Kandidatengene zu finden, die für mögliche Medikamentenziele kodieren (Berman & Sudbery, 2002).

1.2.2 Virulenzfaktoren in *Candida albicans*

Die Virulenzfaktoren von *Candida albicans* betreffen Wachstum unter physiologischen Extremen wie erhöhter Temperatur und außergewöhnlichen pH-Werten, Erkennung des Wirts und Adhäsion an Wirtszellen und -gewebe, Penetration und Nekrose des Gewebes durch Sekretion von Enzymen, Dissemination, Morphologie, Immunmodulation der Wirtsabwehr durch Änderungen der Adhärenzeigenschaften, Antigenexpression und Gewebeaffinität (Chaffin *et al.*, 1998) (Calderone & Fonzi, 2001) (van Burik & Magee, 2001) (Gow *et al.*, 2002) (Poltermann *et al.*, 2005).

1.2.2.1 Wachstum

Candida albicans muss nicht nur fähig sein, im Wachstum mit anderen mikrobiellen Organismen zu konkurrieren, sondern die verschiedenen Gewebe stellen auch eine Vielzahl an physiologischen Extremen dar. Die Fähigkeit, bei Körpertemperatur (37 °C) und Fieber (38-42 °C) wachsen zu können, ist eine wichtige Voraussetzung für eine systemische Infektion (van Burik & Magee, 2001) (Blankenship *et al.*, 2003).

Der pH-Wert variiert vom neutralen Bereich der Blutgefäße und Gewebe bis zum sehr sauren Bereich der Vagina. Die Kolonisierung solch unterschiedlicher Nischen wird durch eine variable Genexpression geregelt. Im neutralen und basischen pH-Milieu wird das Gen *PHR1* (pH regulated protein) exprimiert, dessen Funktion mit Zellwandsynthese assoziiert ist, und dessen Optimum im Neutralen liegt. Im sauren pH dagegen kann dieses Gen nicht exprimiert werden, dafür wird das Gen *PHR2* gebildet, das dieselbe Funktion im sauren pH-Bereich erfüllt (Calderone & Fonzi, 2001) (Soll, 2002). Das Gen *RIM101* kodiert für einen pH-regulierten Transkriptionsfaktor (van Burik & Magee, 2001). In alkalischem Medium reguliert *MDS3* die Expression der Hyphen-assoziierten Gene *HWPI* (hyphal wall protein) und *ECE1* (extent of cell elongation) (Davis *et al.*, 2002). Andere metabolische Gene, die z.B. die Lipidbiosynthese

(*NMT1*, N-myristoyl transferase, *FAS2*, fatty acid synthase), den Kohlenhydratstoffwechsel (*TPSI*, trehalose-6-phosphate synthase, *NTCI*, neutral trehalase, *MIG1*, multicopy inhibitor of GAL-expression), den Eisenmetabolismus (*FTR1*, ferric transporter), oder die Purin- und Pyrimidinsynthese betreffen, haben auch Einfluss auf die Virulenz (Navarro-Garcia *et al.*, 2001) (van Burik & Magee, 2001).

1.2.2.2 Erkennung des Wirts und Adhäsion

Die Adhäsion ist sowohl für das kommensalische Wachstum, erst recht aber als Voraussetzung für eine Kolonisierung zur Entwicklung einer hämatogenen Infektion unerlässlich. *Candida albicans* kann an Epithelzellen, Endothelzellen, lösliche Faktoren, Extrazelluläre Matrix und inertes implantiertes Material wie Katheter, Herzklappen und Diaphragma binden. Die physischen Interaktionen zwischen Pilz und menschlichem Wirt werden über die Zelloberfläche durch Zellwandbestandteile wie Adhesine vermittelt, welche die Anheftung von *C. albicans* an Wirtszellen oder an Liganden der Wirtszellen vermitteln. Sie binden an Proteine der Extrazellulären Matrix von Säugerzellen, wie Fibronectin, Laminin, Fibrinogen und Kollagen Typ I und IV. Zu den Adhesinen gehören die Glykoproteine Als1p, Als2p, Als3p, Als4p, Als5p, Als8p (agglutinin-like sequence), Int1p (integrin-like protein) und Mnt1p (alpha-1,2-mannosyltransferase). Das Zellwand-Mannoprotein Hwp1p (hyphal wall protein) und das Protein Int1p sind Substrate für Transglutaminasen des Wirtsepitheliums, welche die *Candida*-Zelle durch kovalente Bindung mit der Epitheliumsoberfläche verankern. (Calderone & Fonzi, 2001) (van Burik & Magee, 2001) (Berman & Sudbery, 2002).

1.2.2.3 Enzyme

Der Schritt des Krankheitserregers von einer oberflächlichen Infektion in das vaskuläre System erfordert die Schädigung des Gewebes, entweder durch mechanische Penetration oder Nekrose. Für *C. albicans* hebt die Fähigkeit der Hyphen, durch die Zellwand zu wachsen, die Bedeutung des Dimorphismus für die Virulenz hervor (van Burik & Magee, 2001).

Nekrotische Faktoren sind entscheidend für die Virulenz, denn sie erlauben dem Krankheitserreger, strukturelle Barrieren, die den menschlichen Wirt vor invasiven Infektionen schützen sollen, zu überwinden. Nekrotische Faktoren sind meist extrazellulär abbauende Enzyme wie Proteinasen, Phosphatasen und DNAsen, welche die Zellen und das Gewebe des Wirts zerstören.

Die Expression hydrolytischer Enzyme wie sekretierte Aspartylproteinasen (*SAP 1-9*) und Phospholipasen (*PL A-D*) korreliert mit der Gewebeinvasion. *SAP1* und *SAP2* werden in der

frühen Invasionsphase exprimiert. *SAP2* wird hauptsächlich von der Yeast-Form gebildet, aber auch während der Invasion durch endotheliale Barrieren und der Invasion im sauren pH. *SAP1* und *SAP3* werden während des phänotypischen Wechsels reguliert. *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* werden ausschließlich bei neutralem pH während des Serum-induzierten Yeast-to-Hyphae-Übergangs beobachtet, sie dienen auch dem Überleben in Makrophagen und dem Hyphenwachstum. Da diese drei Isoenzyme für die Induktion des *SAP2*-Gens zuständig sind, spielen sie auch eine Rolle für die normale Progression einer systemischen *Candida*-Infektion. *SAP8* wird bei extensiver Penetration exprimiert. Die extrazelluläre Phospholipase *PLB1* ist für das Hyphenwachstum und die Invasionsfähigkeit wichtig, denn sie erleichtert die Penetration von Membranen der Wirtszellen während der Infektion (Chaffin *et al.*, 1998) (Calderone & Fonzi, 2001) (Navarro-Garcia *et al.*, 2001) (van Burik & Magee, 2001) (Soll, 2002).

1.2.2.4 Morphologie

Candida albicans kann sich als dimorphischer Organismus entweder durch Knospung vermehren, was zur Bildung von Yeast-Zellen führt, oder durch Produktion von Keimschläuchen, was in filamentösem Wachstum resultiert und zur Bildung eines Myceliums führt. Die reversible Morphogenese ist essentiell für die Pathogenität. *Candida*-Zellen, die diesen phänotypischen Übergang nicht durchführen können, zeigen reduzierte Infektiosität oder sind völlig avirulent. Das Hyphenwachstum wird durch Kombination zweier bestimmter Bedingungen induziert, es sind hohe Temperatur (37 °C) und Serum, oder hohe Temperatur und neutraler pH (7,0) (Blankenship *et al.*, 2003) (Walther & Wendland, 2004).

Die Hyphenform exprimiert Zellwandproteine, welche die Adhäsion an menschliches Gewebe erleichtern, für die Invasion wichtig sind und helfen, der Phagozytose durch Neutrophile oder Makrophagen zu entkommen. Im Gegensatz dazu dient die Yeast-Form der Verteilung durch den Blutstrom. Die Proteine Hwp1p (hyphal wall protein), Hyr1p (hyphally regulated gene), Als3p (agglutinin-like sequence), Int1p (integrin-like protein) und Csa1p (*Candida* surface antigen) werden beispielsweise nur von der Hyphenform exprimiert (Chaffin *et al.*, 1998) (van Burik & Magee, 2001) (Berman & Sudbery, 2002) (Bliss *et al.*, 2003). Das Protein Calcineurin ermöglicht *C. albicans* das Überleben in Anwesenheit von Serum. Es ermöglicht so die Dissemination und Gewebeinvasion während der Infektion (Blankenship *et al.*, 2003).

Bei Biofilmen auf Kathetern konnte festgestellt werden, dass erst der Kontakt zur Oberfläche bei den Zellen den Übergang zu filamentösem Wachstum induziert. Die Biofilme bestehen aus zwei morphologisch unterschiedlichen Lagen: einer dünnen, basalen Schicht aus dicht

gepackten Yeast-Zellen und darüber eine lockere Schicht aus Hyphenzellen. Dabei verankert die untere Schicht den Biofilm mit der Oberfläche, während die obere Schicht durch zahlreiche Wasserkanäle die Nährstoffversorgung gewährleistet (Douglas, 2003) (Jin *et al.*, 2005).

1.2.2.5 Immunmodulation

Die Phagozytose durch die Wirtszellen gibt dem Krankheitserreger die Möglichkeit, endotheliale Zellen zu befallen (van Burik & Magee, 2001). Das Immunsystem des Wirts bekämpft *Candida albicans* mittels Endozytose durch Makrophagen und Neutrophile. Dieser Krankheitserreger jedoch vermag die Apoptose in Makrophagen und Neutrophilen durch Expression von Phospholipomannan auf der Zellwandoberfläche zu induzieren. Das α -1,2-Oligomannosid agiert als Adhesin, bindet an die Wirtszellen und stimuliert sie durch diesen Kontakt. In der Folge wird durch Modulation des *MEK-ERK*-Signalweges über die Dephosphorylierung von *BAD* die Apoptose ausgelöst (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003). Auch können ingestierte *Candida*-Zellen durch Ausbildung von Hyphen die Makrophagenmembran lysieren und dadurch der Wirtsabwehr entkommen (Berman & Sudbery, 2002).

Ein wichtiger Mechanismus für die Überwindung der endothelialen Barrieren während der Invasion ist die Nutzung humaner körpereigener Enzyme. Plasminogen kommt beispielsweise reichlich in menschlichem Plasma und extrazellulärer Flüssigkeit vor. Es wird durch Plasminogenaktivatoren in seine aktive Form Plasmin überführt, das dann die Extrazelluläre Matrix abbaut, Fibrinolyse und Zellmigration auslöst. Das auf der Zelloberfläche von *C. albicans* exprimierte Enzym Enolase, das auch sekretiert werden kann, übt die Funktion eines Plasminogen- und Plasminrezeptors aus. Zum einen wirkt Enolase als Plasminogenaktivator, zum anderen erhält es Plasmin in seiner aktiven Form. Durch die proteolytische Aktivität des Plasmins wird die Passage des vaskulären Endotheliums erleichtert, was die schnelle Verbreitung und Kolonisierung der Zielorgane erklärt (Jong *et al.*, 2003).

1.2.3 Vakuolenfunktion, Vakuolenmorphologie und Virulenz

Die Vakuole ist ein saures, membranumhülltes Kompartiment, das verschiedene hydrolytische Enzyme beinhaltet. Sie ist funktionell gesehen dem Lysosom der Säugerzellen analog. Ihre Aufgabe ist der Abbau zellulärer Proteine zur Wiederverwendung der Aminosäuren, der Umsatz von Makromolekülen und die Speicherung zellulärer Metabolite wie Aminosäuren, Phosphate und Ionen. Eine funktionale Vakuole ist wichtig für die cytoplasmatische Homöostase von Ionen, Nährstoffen, pH-Wert und Osmolarität. Die Vakuole ist für die Detoxifikation zuständig, dient als Phosphatquelle oder Energievorrat und als Stickstoffvorrat während

Hungerphasen (Bruckmann *et al.*, 2001) (Poltermann *et al.*, 2005). Zwar ist die Vakuole nicht essentiell für das vegetative Wachstum, aber sehr bedeutsam für Stressperioden wie Hunger oder Wachstum bei erhöhten Temperaturen. Bei pathogenen Hefespezies spielt die Vakuole eine Schlüsselrolle bei der Anpassung des Pilzes an verschiedene Umwelten im Wirt. Zusätzlich wird die Vakuole für zelluläre Differenzierungsprozesse wie den Yeast-to-Hyphae-Übergang benötigt. Die Hyphenbildung wird von einem schnellen Anstieg des vakuolären Volumens begleitet, der durch Migration von cytoplasmatischem Material in die Hyphenspitze verursacht wird. Erst beim weiteren Wachstum der Hyphe wandern subapikale Kompartimente und der Protoplast in die Hyphe ein. Durch diesen Mechanismus wird nur eine geringen Menge an *de novo*-Synthese von cytoplasmatischem Material benötigt, während *Candida* die Möglichkeit hat, sich rasch zu vermehren und seine Umwelt zu erkunden (Palmer *et al.*, 2003) (Eck *et al.*, 2005).

Eine Studie konnte bereits zeigen, dass Deletionsmutanten vakuolärer Proteine wie des Proteins Vps11p (vacuolar protein sorting) nicht nur Defekte in der Vakuolenfunktion und Vakuolenbiogenese hervorrufen, sondern auch die Yeast-to-Hyphae-Morphogenese stark beeinträchtigen (Palmer *et al.*, 2003).

VPS34 kodiert für eine Phosphatidylinositol(PI)3-Kinase, die unter anderem den vesikulären und intrazellulären Protein-, Lipid- und Membrantransport vom späten Golgi-Kompartiment zur Vakuole bei Endo- und Exozytose reguliert. Die Deletion dieses Gens führt zu Hypersensitivität gegenüber osmotischem Stress, Zunahme des Vakuolenvolumens, Defekten in der Ansäuerung des Vakuolenlumens, verminderter Yeast-to-Hyphae-Morphogenese und reduzierter Haftung an Fibroblasten, was mit der Abnahme der Virulenz korreliert (Bruckmann *et al.*, 2000) (Bruckmann *et al.*, 2001) (Eck *et al.*, 2005) (Poltermann *et al.*, 2005). *MLT1* (MRP-like transporter) wurde als erster vakuolärer ABC-Transporter beschrieben; es ist ein kleiner organischer Anionentransporter, mit Präferenz für Substanzen, die mit Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert sind. Mlt1p ist in die Entgiftung von Substanzen, die von Phagozyten produziert werden, sowie in die Stressantwort, die aufgrund von Veränderungen im Wirtsorganismus bei peritonealer Infektion entsteht, involviert. Die Deletion von Mlt1p führt zu einer reduzierten Infektiosität im murinen Peritonitis-Modell (Theiss *et al.*, 2002).

Da beispielsweise Rezeptoren der Plasmamembran zum Recycling zur Vakuole transportiert werden müssen oder einige vakuoläre Proteine als *second messenger* von Signalkaskaden dienen, könnten ebendiese Proteine, die auf intrazelluläre Transportprozesse einwirken, viel versprechende Kandidaten für Therapien gegen Pilze sein. Der Einfluss von Komponenten

des sekretorischen Transports und des Proteintransports auf die Pathogenität von *Candida albicans* ist noch recht unbekannt. Der Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Vakuole ist in die Virulenz von *C. albicans* involviert, eventuell trifft dies auch auf die Vakuolenfunktion an sich zu (Bruckmann *et al.*, 2000) (Bruckmann *et al.*, 2001).

1.2.4 Hyphenbildung und Virulenz

C. albicans kann in drei verschiedenen Formen auftreten. Die Zellen der einzelligen sog. Yeast-Form haben eine runde bis ovale Gestalt (Blastospore) und treten hauptsächlich in reichhaltigem Medium auf. Pseudohyphen dagegen sind lang gestreckte Zellen, die sich an bestimmten Punkten berühren. Viele Zellen zusammen bilden Verästelungen aus, die ein schnelles Erkunden der Umgebung ermöglichen. Hyphen schließlich sind lang gestreckte, polarisierte Zellen, deren Form durch Aktinfilamente erhalten wird. Filamentöses Wachstum erfolgt als Antwort auf Nährstoffmangel, Serum oder andere Umweltveränderungen wie z.B. den Wechsel von aerobem zu fermentativem Metabolismus oder Wachstum in Anwesenheit von N-Acetylglucosamin (van Burik & Magee, 2001) (Berman & Sudbery, 2002) (Palmer *et al.*, 2003) (Palmer *et al.*, 2004) (Zheng *et al.*, 2004).

Der Übergang zwischen Yeast- und Hyphenform wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie z.B. durch Cph1p und Cph2p über die MAP-Kinase-Kaskade und durch Efg1p über den Ras-cAMP-Proteinkinase-Weg induziert. Die verschiedenen Signaltransduktionswege konvergieren in der gemeinsamen Regulation von Zellwandproteinen, von Proteinasen, wie den Hyphen-assoziierten SAPs, sowie der Morphogenese. Die Deletion von *CPHI* führt zu einer Verlangsamung der Hyphenbildung, während bei Fehlen von *EFGI* (enhanced filamentous growth) überhaupt keine Hyphenbildung möglich ist. Ebenso zeigen die *EFGI*-Deletionsmutanten eine signifikant abgeschwächte Virulenz, verlangsamte Interaktion mit Makrophagen und Neutrophilen, verändertes *SAP*-Expressionsmuster, verminderte Fähigkeit zur Kolonisierung von Kathetern sowie reduzierte Fähigkeit zur Invasion in endotheliales, epidermales oder intestinales Gewebe (Korting *et al.*, 2003). Das E3-Ubiquitin-Ligationsenzym *NOT4* ist dagegen nicht für die Initiation zur Hyphenbildung, sondern für die Aufrechterhaltung der bereits gebildeten Hyphen verantwortlich. Die Deletion dieses Gens führt zu Avirulenz (Krueger *et al.*, 2004). Die Transkriptionsfaktoren Tup1p, Nrg1p und Rfg1p scheinen die für das Hyphenwachstum benötigten Gene zu reprimieren. Eine Deletion dieser Faktoren führt zu konstitutiver Ausbildung von Pseudohyphen und Hyphen (Berman & Sudbery, 2002). Bei einem gestörten Wechsel von Filamentation zur Yeast-Form resultiert Avirulenz, da die effektive Verbreitung im Wirtsorganismus verhindert wird. Dies ist bei Deletion des

Gens für Phosphodiesterase *PDE2* der Fall. Die Hefen können nach Hemmung des cAMP-Signalweges nur noch Pseudohyphen bilden (Bahn *et al.*, 2003). Auch Gene des Zellzyklus wie *FKH2* sind für die Morphogenese wichtig, da sie das Umschalten zwischen isotropischem Wachstum der Yeast-Zellen und polarisiertem Wachstum der Filamente ermöglichen (Berman & Sudbery, 2002).

1.2.5 Gendeletionen in *Candida albicans*

Candida albicans besitzt ein diploides Genom und hat offenbar keinen kompletten Generationszyklus, so dass genetische Manipulationen durch einfache Kreuzung nicht möglich sind. Zur Prüfung der Genfunktion muss ein Gen erst durch seine Sequenz identifiziert werden, und anschließend werden beide Allele nacheinander deletiert oder mutiert. Die Translation des CUG-Codons als Serin anstelle des universellen Leucins schließt heterologe Marker aus, es sein denn, deren CUG-Codons wurden zuvor modifiziert. Da deswegen bei *Candida albicans* die üblicherweise verwendeten dominanten Markergene wie Antibiotikaresistenzgene nicht funktionieren, wird meist die sog. *URA3*-Blaster-Methode verwendet. Sie beruht auf der wiederholten Verwendung eines gebräuchlichen auxotrophen Selektionsmarkers (*URA3*), der nach Transformation das gewünschte Gen an seinem genomischen Locus ersetzt. Voraussetzung sind ein Hintergrundstamm ohne *URA3* sowie die Konstruktion einer Plasmid-Kassette mit dem Markergen, das von den Sequenzen des Zielgens am 5'- bzw. 3'-Ende flankiert wird, welche die homologe Rekombination mit dem Zielgen ermöglichen. Da *URA3*-negative Stämme resistent gegen 5-Flouoroorotic Acid (5-FOA) sind, erfolgt die Selektion der Transformanten in 5-FOA-Minimalmedium. Die Entfernung des Markergens kann nur durch spontane Gendeletion erfolgen.

Die *URA3*-Flipper-Methode basiert auf der Verwendung der *FLP*-Rekombinase unter der Kontrolle des induzierbaren *SAP2*-Promoters. Die Kassette, bestehend aus *URA3*-Selektionsmarker, *SAP2*-Promoter und *FLP*-Rekombinase, wird von direkten Wiederholungen der *FLP*-Erkennungssequenz flankiert, so dass nach der Insertion der Kassette in das Zielgen eine induzierte, *FLP*-vermittelte Entfernung möglich wird.

Das *URA3*-Gen kodiert in *C. albicans* für Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase. Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der *de novo*-Pyrimidin-Biosynthese, die Umwandlung von Orotidin-5'-Monophosphat (OMP) zu Uridin-5'-Monophosphat (UMP) (Lay *et al.*, 1998) (Morschhäuser *et al.*, 1999) (Berman & Sudbery, 2002) (Barelle *et al.*, 2003) (Iwaguchi *et al.*, 2004).

1.2.6 Test der Virulenz von *Candida albicans*

Die Virulenz wird typischerweise mit dem Mausmodell für systemische Candidosis durch Injektion der *Candida*-Zellen in die Blutbahn des Versuchstieres bestimmt. Im Tiermodell für systemische Candidosis wurde jedoch gezeigt, dass *URA3* ebenfalls ein Virulenzfaktor ist. Die Expression des *URA3*-Markergens ist nämlich von der Lokalisierung im Genom abhängig. Die variable Expression kann die Folge von epigenetischer Regulation oder von Positionseffekten sein. Der Expressionslevel beeinflusst *in vivo* die Wachstumsrate sowie die Adhäsion, und damit die Virulenz. *URA3*-auxotrophe *Candida*-Mutanten erwiesen sich als avirulent, da in der systemischen Umgebung des Wirts nicht genügend Uridin zur Verfügung zu stehen scheint. Um Positionseffekte der *URA3*-Expression *in vivo* zu vermeiden, sollte man isogenetische Stämme herstellen, bei denen das *URA3*-Gen in allen zu testenden Stämmen am selben Locus exprimiert wird. (Lay *et al.*, 1998) (Calderone & Fonzi, 2001) (Berman & Sudbery, 2002) (Staab & Sundstrom, 2003).

1.2.7 Membranfusion der Vakuole und die zehn vakuolären Kandidatengene

Um zu untersuchen, ob die Vakuole einen Einfluss auf die Virulenz von *Candida albicans* ausübt, wurden für diese Arbeit zehn Gene ausgewählt, deren Funktion in *S. cerevisiae* bereits bekannt ist. *Saccharomyces cerevisiae* wird als benigner Verwandte von *Candida albicans* angesehen. *S. cerevisiae* und *C. albicans* trennten sich stammesgeschichtlich vor 140-841 Millionen Jahren. Ihre große Ähnlichkeit bietet den Vorteil, viele der basalen biologischen Prozesse wie Zellzyklusprogression, Signaltransduktion, Paarung, Stoffwechsel und Zellwandbiosynthese, die in *S. cerevisiae* bereits gut untersucht wurden, auch in *C. albicans* dadurch schnell zu verstehen (Berman & Sudbery, 2002).

Die Kandidatengene *NYV1*, *VAC8*, *VAM3*, *VAM7*, *VPS33*, *VPS41*, *VTC1*, *VTC3*, *VTC4* und *YTP7* kodieren für vakuoläre Proteine, die an der Membranfusion der Vakuole beteiligt sind. Membranfusionen ereignen sich zwischen allen intrazellulären Kompartimenten. Der Ablauf der Fusion sieht in Kürze wie folgt aus:

Tethering: Tethering-Faktoren und Rab-GTPasen vermitteln die initialen Kontakte zwischen den Membranen. Danach werden *cis*-SNARE-Komplexe (SNARE, soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) durch die ATPase Sec18p (NSF, *N*-ethylmaleimide sensitive factor) aktiviert, die via Sec17p (\square -SNAP, soluble NSF attachment protein) an SNAREs bindet. Vtc1p und Vtc4p (vacuolar transporter chaperon) regulieren die Aktivierung der SNAREs durch Sec18p. Dies führt zur Dissoziation der *cis*-Komplexe und zur Freisetzung von \square -SNAP nach ATP-Hydrolyse. Die Reaktion benötigt zusätzlich Phosphati-

dylinositol-4,5-bisphosphat und Ergosterol. Das Co-Chaperon Lma1p (Low-molecular weight factor1) löst sich von Sec18p und bindet an Vam3p (vacuolar morphology; Syntaxin-Homolog). Die aktivierten SNAREs werden durch die Interaktion mit Lma1p stabilisiert. Der HOPS-Komplex (homotypic fusion and vacuole protein sorting, mit den Proteinen Vam2p und Vam6p) und der Klasse C-VPS -Komplex (vacuole protein sorting, mit den Proteinen Vps11p, Vps16p, Vps18p, Vps33p Vps39p und Vps41p) überführen die Rab-GTPase Ypt7p (yeast protein two homolog) in ihre aktive Form. Ypt7p und das Protein Vam7p werden an den HOPS-Komplex gebunden und vermitteln zusammen mit Tethering-Faktoren die ersten Interaktionen zwischen den Membranen. Das periphere Membranprotein Vac8p (vacuolar protein8) wird acetyliert.

Docking: Vps33p (vacuole protein sorting) ist in den Transport vom Golgi-Apparat zur Vakuole involviert. Es wird nach dem Priming aus dem HOPS-Komplex freigesetzt und initiiert durch Bindung an Ypt7p das Docking und wird bis zur Vollendung des Dockings benötigt. Ypt7p aktiviert die Rho-GTPasen Rho1p und Cdc42p. Nyv1p (new yeast v-SNARE; Synaptobrevin) stabilisiert die Docking-Phase der vakuolären Membranfusion durch Ausbildung von *trans*-SNARE-Paaren zwischen Nyv1p der einen Membranseite und dem t-SNARE Vam3p der gegenüberliegenden Membran. Durch Bildung der *trans*-SNARE-Paare werden die Membranen in enge Nachbarschaft gebracht. Der SNARE-Rezeptor Vam7p stabilisiert die Interaktionen anderer SNARE-Komponenten. Das Vakuolenlumen ist angesäuert, wodurch ein vakuoläres Membranpotenzial entsteht. Die Öffnung von Ca²⁺-Kanälen in den Membranen führt zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem Vakuolenlumen. Calmodulin agiert als Ca²⁺-Rezeptor und bindet an die integrale V₀-Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase. Dadurch wird die Bildung von *trans*-V₀-Komplexen zusammen mit Vam3p ausgelöst. Calmodulin und die Proteinphosphatase PP1p verstärken die enge Bindung zwischen den Membranen (Post-docking). PP1p und Vtc3p veranlassen die Freisetzung von Lma1p. Das ebenfalls zum HOPS-Komplex gehörende Vps41p wird unbedingt für das Docking benötigt und aktiviert die Phosphoprotein-Phosphatase Pho8p. G-Aktin polymerisiert während der Fusionsreaktion zu F-Aktin; Aktin reguliert die Proteinlokalisierung während des Dockings.

Membranfusion: Die Fusion der Lipiddoppelmembranen benötigt die Vtc-Proteine und Vac8p und führt zur Mischung des Vakuolenlumens. Die Proteine Vtc1p, Vtc2p, Vtc3p und Vtc4p sind mit der vakuolären H⁺-ATPase assoziiert. Sie beeinflussen die Konformation und molekularen Interaktionen der V₀-Untereinheit Vph1p (vesicular H⁺-ATPase proton pump). Das palmitoylierte Vac8p erleichtert die Vermischung der Lipiddoppelmembranen und interagiert mit dem Aktincytoskelett. Vtc3p wird für die Dissoziation der *trans*-V₀-Komplexe in der

Endphase der Fusion benötigt (Banta *et al.*, 1990) (Mayer & Wickner, 1997) (Nakamura *et al.*, 1997) (Radisky *et al.*, 1997) (Peters & Mayer, 1998) (Ungermann & Wickner, 1998) (Sato *et al.*, 1998) (Mayer, 1999) (Eitzen *et al.*, 2001) (Laage & Ungermann, 2001) (Veit *et al.*, 2001) (Wickner, 2002) (Müller *et al.*, 2002) (Seeley *et al.*, 2002) (Bayer *et al.*, 2003) (Müller *et al.*, 2003) (Peters *et al.*, 2004) (Subramanian *et al.*, 2004) (Dietrich *et al.*, 2005).

1.3 Autophagie bei Tumorzellen

1.3.1 Autophagie Allgemein

Das Wort „Autophagie/Autophagozytose“ entstammt dem griechischen und setzt sich aus den Worten „selbst“ („auto“) und „essen“ („phagy“) zusammen. Das Phänomen der „Selbst-Verdauung“ cytoplasmatischer Anteile zur physiologischen Neuorientierung wurde von Ashford und Porter entdeckt (Ashford & Porter, 1962) (Levine & Klionsky, 2004).

Autophagie ist die generelle Bezeichnung für intrazelluläre Prozesse, bei denen cytosolische Komponenten innerhalb Lysosomen mit Hilfe lysosomaler Enzyme degradiert werden. Das Ergebnis ist immer ein kompletter und irreversibler Abbau des Substrats zu seinen essentiellen Bestandteilen (Proteine zu Aminosäuren, Nukleinsäuren zu Nukleotiden, Lipide zu freie Fettsäuren). Autophagie ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, der in Eukaryoten wie Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Schleimpilzen (*Dictyostelium discoideum*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Fliegen (*Drosophila melanogaster*) und Säugern (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) erhalten ist (Cuervo, 2004) (Levine & Yuan, 2005) (Levine & Klionsky, 2004) (Meijer & Codogno, 2004).

Die Erforschung der molekularen Mechanismen der Autophagie anhand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus begann mit Ohsumi 1992. Die Entdeckung einer Genfamilie, die von Hefen bis Säuger konserviert ist zeigt die Bedeutung der Autophagie in Physiologie und Pathophysiologie (Tsukada & Ohsumi, 1993) (Kim & Klionsky, 2000) (Mizushima *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004).

1.3.2 Funktion der Autophagie

Generell gibt es zwei Abbausysteme für Proteine in der Zelle: Durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg werden kurzlebige Proteine der Zellzykluskontrolle oder Proteine, die Teil der Stressantwort auf DNA-Schäden sind, selektiv degradiert (Kim & Klionsky, 2000) (Mizushima *et al.*, 2003) (Edinger & Thompson, 2003). Mehr als 90 % der Proteine in der Zelle haben eine lange Halbwertszeit und eine Änderung der Abbaurate dieser langlebigen

Proteine kann die Proteinmasse und Proliferationsfähigkeit einer Zelle drastisch verändern. Für langlebige Proteine und Organellen gibt es drei Wege vom Cytoplasma zu den Lysosomen: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie, wobei der Makroautophagie (meist einfach Autophagie abgekürzt) der Großteil der intrazellulären Degradation zukommt (Mizushima *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004) (Gozuacik & Kimchi, 2004).

Bei der Mikroautophagie wird cytoplasmatisches Material (Cytosol, Peroxisomen und sogar Teile des Nukleus) direkt an der Lysosomenoberfläche durch Invagination, Protusion und/oder Septation aufgenommen. Diese schlauchartigen Einstülpungen schnüren sich ab und setzen intralysosomale Vesikel (autophagische Körper) frei. Lysosomale Hydrolasen degradieren die Vesikel und stellen die Abbauprodukte zur Wiederverwertung zur Verfügung (Levine & Klionsky, 2004) (Majeski & Dice, 2004) (Thompson *et al.*, 2005).

Die Chaperon-vermittelte Autophagie ist ein direktes und selektives Degradationssystem, bei dem cytosolische Proteinsubstrate aufgrund eines spezifischen Pentapeptid-Signals (KFERQ-Sequenzmotiv) von cytosolischen und lysosomalen Co-Chaperonen der Hsc70-Familie erkannt werden. Der Proteinkomplex bindet an einen lysosomalen Rezeptor (Lamp2a, Lysosomal associated membrane protein2a). Das Substrat wird entfaltet, in das Lysosomenlumen transportiert und mit Hilfe lysosomaler Proteasen abgebaut (Ogier-Denis & Codogno, 2003) (Majeski & Dice, 2004) (Mizushima, 2004) (Schmid *et al.*, 2006).

Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase zählt zur Hauptaufgabe der Autophagie, daher ist sie konstitutiv auf basalem Niveau in allen Zelltypen, die über ein lysosomales Kompartiment verfügen. Durch Autophagie werden v.a. beschädigte oder überflüssige Produkte entfernt, davon sind sowohl lösliche cytosolische Proteine als auch Organellen (Mitochondrien, Peroxisomen, Ribosomen und Endoplasmatisches Retikulum) oder Organellenteile (Regionen des Golgi-Apparates oder des Endoplasmatischen Retikulums und sogar Bereiche des Zellkerns) betroffen. Die Zusammensetzung des Cytoplasmas und die Größe des Endoplasmatischen Retikulums wird so reguliert (Meijer & Codogno, 2004) (Codogno & Meijer, 2005). Autophagie spielt eine Rolle in (Embryonal)Entwicklung, Differenzierung, Gewebebildung, Wachstumskontrolle (Proliferation, Änderung des Zellvolumens), Immunabwehr (Antigenpräsentation, Entfernung intrazellulärer Krankheitserreger und toxischer Metabolite), Anpassung an schlechte Umweltbedingungen (Nährstoff-, Sauerstoff- oder Energiemangel, Temperatur, Zelldichte), Alterung, Zelltod, Krebs und dessen Therapie (Bestrahlung und Xenobiotika-Behandlung), Neurodegenerative Krankheiten (Anhäufung missgefalteter Proteine

und Proteinaggregaten) und Kardiomyopathien (Meijer & Codogno, 2004) (Cuervo, 2004) (Levine & Yuan, 2005) (Pattingre *et al.*, 2005).

Autophagie stellt einen essentiellen Prozess dar, der über seine Sensibilität gegenüber zahlreichen Stimuli, welche mittels einer Vielzahl von Signalmolekülen übermittelt werden, charakterisiert ist. Zu diesen Signalmolekülen zählen Aminosäuren, Hormone, GTPasen, heterotri-mere und monomere G-Proteine, Kinasen (Rezeptor-Tyrosinkinasen, Casein-Kinase II, *ERK1/2* und p38 MAP-Kinasen, Protein-Kinase A, p70S6-Kinase, mTOR-Kinase, Klasse I und Klasse III PI3-Kinasen), Calcium, cAMP, ATP und die Zellgröße (Kim & Klionsky, 2000) (Tassa *et al.*, 2003) (Ogier-Denis & Codogno, 2003) (Levine & Yuan, 2005).

1.3.3 Autophagie physiologisch/pathophysiologisch

Autophagie kann bei Krankheiten sowohl eine schützende als auch eine schädigende Rolle übernehmen. Einerseits wird durch den Abbau intrazellulärer Makromoleküle Energie bereitgestellt, die für die Minimalfunktionen bei Adaptation und Überleben unter extremen Bedingungen benötigt werden. Zusätzlich werden Toxine, Krankheitserreger, reaktive oxidative Spezies, veränderte cytosolische Komponenten wie Proteinaggregate, beschädigte und ungebrauchte Organellen und Proteine abgebaut (Levine & Klionsky, 2004) (Shintani & Klionsky, 2004). Andererseits kann Autophagie Programmierem Zelltod Typ II induzieren. Eine Disregulation der Autophagie wird mit der Pathogenese vieler Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Meist sind nichtproliferierende Zellen wie Muskelzellen oder Neuronen betroffen, bei denen die Akkumulation beschädigten Materials belastend ist. Autophagie beeinflusst Kardiomyopathien, skeletale Myopathien und muskuläre Atrophien, neurodegenerative Erkrankungen (Morbus Huntington, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amylotrophe Lateralsklerose), bakterielle und virale Infektionskrankheiten (*Brucella abortus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania* spp., *Coxiella burnetii*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Herpes simplex-Virus, Poliovirus1) (Klionsky & Emr, 2000) (Eskelinen *et al.*, 2002) (Petiot *et al.*, 2002) (Qu *et al.*, 2003) (Webb *et al.*, 2003) (Ravikumar *et al.*, 2003) (Ogier-Denis & Codogno, 2003) (Rich *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004) (Cuervo, 2004) (Levine & Klionsky, 2004) (Shintani & Klionsky, 2004) (Gonzalez-Polo *et al.*, 2005) (Boya *et al.*, 2005) (Levine & Yuan, 2005) (Klionsky, 2005b) (Colombo, 2005) (Schmid *et al.*, 2006).

1.3.4 Autophagie und Tumorentstehung

Es wurde festgestellt, dass sowohl die Aktivierung als auch die Hemmung der Autophagie nützlich für Tumorzellen sein kann. Normalerweise stoppt das Zellwachstum, wenn Zellen Konfluenz erreichen und vom anabolen zum katabolen Stoffwechsel übergehen. Falls keine Autophagie aktiviert werden kann, dominiert weiterhin die Proteinsynthese über den Proteinabbau - und unbegrenztes Zellwachstum ist ein typisches Charakteristikum von Tumorzellen. Die Hemmung der Autophagie führt zu einer gewissen Resistenz gegenüber Antitumorbehandlungen, wenn kein autophagischer Zelltod aktiviert werden kann.

Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung der Autophagie vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien vorteilhaft, um das zelluläre Überleben unter extremen Bedingungen sicherzustellen. Zellen in den zentralen Bereichen eines soliden Tumors verfügen meist über eine ungenügende Gefäßversorgung. Um das niedrige Angebot an Nährstoffen, Sauerstoff und Energie zu kompensieren, das diese Zellen über den Blutstrom erreicht, wird Autophagie zum Abbau entbehrlicher intrazellulärer Makromoleküle aktiviert. Nach Strahlen- oder Chemotherapie schützt Autophagie die Zelle vor Schäden, die durch genotoxischen Stress wie freie Radikale induziert werden, indem sie die Proteine und Organellen beseitigt, welche die Quelle oder das Ziel solcher Schädigungen sind, bevor deren intrazelluläre Anreicherung die Apoptose auslösen würde (Edinger & Thompson, 2003) (Cuervo, 2004) (Gozuacik & Kimchi, 2004) (Shintani & Klionsky, 2004) (Alva *et al.*, 2004) (Kondo *et al.*, 2005) (Baehrecke, 2005).

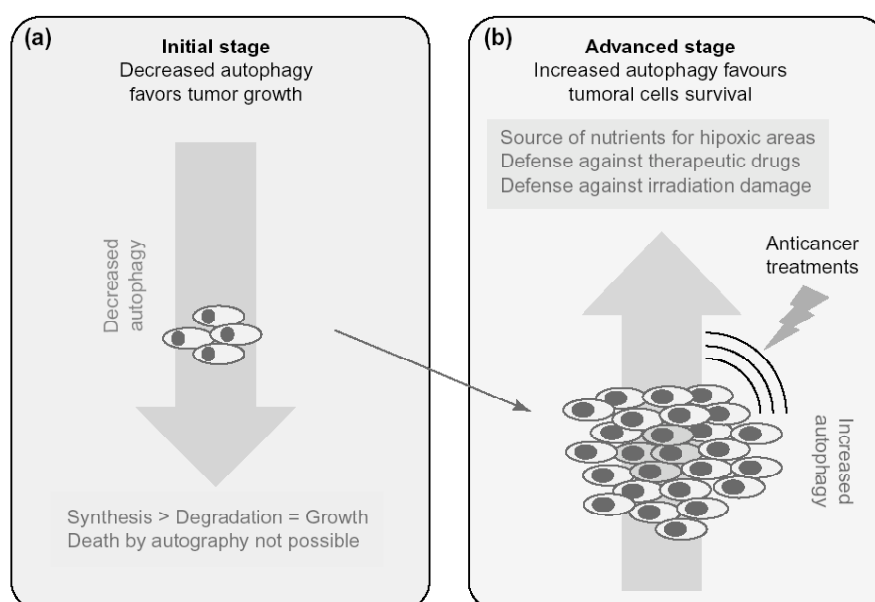


Abbildung 1: Hypothetisches Modell für die zweifache Rolle der Autophagie bei Tumoren. Nach (Cuervo, 2004).

Autophagie vermag Zellen gegen Tumorentstehung durch Limitierung der Zellgröße, Abbau beschädigter Organellen, Zulassung zellulärer Differenzierung, Erhöhung des Protein-Katabolismus, Aufrechterhaltung einer niederen Mutationsrate, Vorbeugung vor abnormem Wachstum und/oder Aktivierung des autophagischen Zelltods zu schützen (Alva *et al.*, 2004) (Baehrecke, 2005) (Levine & Yuan, 2005). Transformierte und maligne Zellen weisen oft einen erniedrigten basalen Autophagie-Level verglichen zur Proteolyseaktivität des normalen umliegenden Gewebes auf. Die Reduktion der Autophagie-Rate in malignen Zellen deutet an, dass das Fehlen autophagischer Signale ein Instrument zur Tumorentstehung darstellt, die betroffenen Zellen zeigen keinen erhöhten autophagischen Proteinabbau als Antwort auf Serumentzug oder hohe Zelldichte, die proliferative Kapazität steigt und die Induktion des Typ II Programmierten Zelltods entfällt. Die Abnahme der Autophagie-Aktivität korreliert mit dem Tumorstadium und dem Differenzierungsstatus der Tumorzellen (Qu *et al.*, 2003) (Ogier-Denis & Codogno, 2003) (Gozuacik & Kimchi, 2004) (Meijer & Codogno, 2004) (Kondo *et al.*, 2005).

Bis heute ist eine Anzahl verschiedener Tumorsuppressorgene identifiziert, die ihre Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen erfüllen, dazu gehören Zellzyklus- und Apoptoseregulation, DNA-Reparatur und Erhaltung der genomischen Stabilität. Autophagie wird negativ durch Onkogene des Klasse I *PI3-K/AKT*-Signalweges und positiv durch die Tumorsuppressorgene *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10), *TSCI/Tuberin* und *TCS2/Hamartin* reguliert. Autophagische Gene könnten eine neue Klasse von Tumorsuppressorgenen repräsentieren, denn der Ausfall der Autophagie stellt einen neuen Tumorigenese-Mechanismus dar (Qu *et al.*, 2003) (Yue *et al.*, 2003) (Gozuacik & Kimchi, 2004) (Klionsky, 2005a).

Da humane Tumoren oft Mutationen aufweisen, die sie resistent gegenüber Apoptose machen, erlangt die Beseitigung dieser Tumorzellen mittels autophagischen Zelltods besondere Bedeutung. Dieser Sachverhalt könnte therapeutisch durch Autophagie-induzierende Mittel ausgenutzt werden (Cuervo, 2004) (Levine & Yuan, 2005). Brust-, Kolon- und Prostatakarzinomzellen akkumulieren bei niedrigen Bestrahlungsschäden saure vesikuläre Organellen autophagischen Ursprungs als Schutzmechanismus, der das Überleben bestrahlter Zellen erhöht. Da auch Lysosomen in Medikamenten-Resistenz von Brustkrebszellen einbezogen sind, wird vermutet, dass die Hemmung der Autophagie den Zelltod von Tumorzellen steigert (Altan *et al.*, 1998) (Paglin *et al.*, 2001) (Ogier-Denis & Codogno, 2003).

1.3.5 Molekulare Signalwege und die autophagischen Kandidatengene

Die Entdeckung der *APG*-Gene (AutoPhaGy, (Tsukada & Ohsumi, 1993)), *AUT*-Gene (AUTophagocytosis, (Thumm *et al.*, 1994)) und *CVT*-Gene (Cytoplasm-to-Vacuole Targeting, (Harding *et al.*, 1995)), welche die Autophagie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* regulieren, tragen zum Verständnis der molekularen Kontrolle der Autophagie bei.

Der Autophagie-Prozess kann wie andere subzellulären Transportprozesse in die Schritte Induktion (1), Bildung des Autophagosoms (2), Annäherung und Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom (3) und Abbau des autophagischen Körpers (4) unterteilt werden.

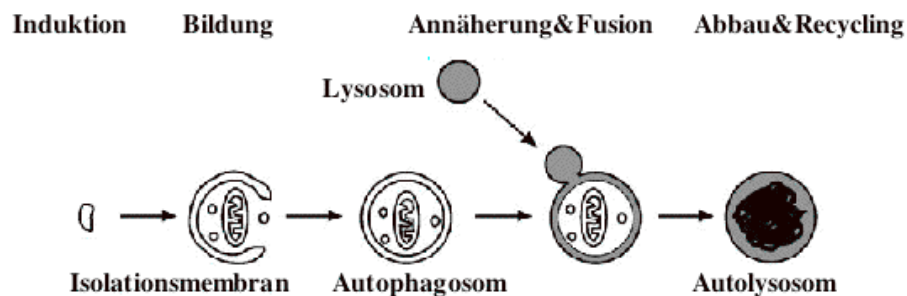


Abbildung 2: Schema der Autophagie im Säugersystem. Nach (Klionsky & Emr, 2000) (Mizushima *et al.*, 2003).

Während der Induktionsphase wird ein Teil des Cytosols und/oder Organellen von einer autophagischen Isolationmembran umschlossen und bildet ein Doppelmembranvesikel (Autophagosom). Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert mit einem Lysosom und setzt den inneren Vesikel (autophagischen Körper) ins Lumen frei. Lysosomale Enzyme degradieren und recyceln das eingeschlossene Material.

Die Induktion wird sowohl über die Entwicklung als auch über das Nährstoffangebot reguliert, die Mehrheit der *APG*-Gene wird jedoch konstitutiv exprimiert. Die Bildung des frühen Autophagosoms beginnt mit einer Doppelmembran (Isolationmembran), die bei Verlängerung einen Teil cytoplasmatischen Materials einschließt. Die Expansion dieser prä-autophagosomalen Membran wird durch Signalmoleküle, GTPasen ($G\alpha_{i3p}$, Ypt7p), PI3-Kinasen (TORp, Apg1p) und Phosphatasen (PP2Ap) über die Aktivität autophagischer Gene kontrolliert (Dunn, 1990a) (Fengsrud *et al.*, 1995) (Ohsumi, 2001) (Petiot *et al.*, 2002). In Autophagosomen eingeschlossen werden Mitochondrien, Peroxisomen, glatte und raue Membranen und cytosolische Komponenten wie Proteine, Glykogen, neutrale Lipide, RNA und Ribosomen. Für die Annäherung und Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom bedarf es einiger Komponenten des sekretorischen und endozytotischen Transportsystems wie

Rab-Proteine (kleine GTPasen Ykt6p) und SNAREs (Vti1p, Vam3p) dazu Mikrotubuli, Aktinfilamente und der Aufrechterhaltung des sauren pHs (Klionsky, 2005b).

Durch die anschließende vakuoläre Ansäuerung mittels Protonen-ATPase wird das frühe Autophagosom zu einem späten Autophagosom transformiert. Die Fusion mit bereits existierenden Lysosomen oder späten Endosomen stellt die lysosomalen Hydrolasen zum Abbau des Vakuoleninhalts bereit. In diesem finalen Stadium wird der Vesikel Autophagolysosom oder Autolysosom genannt (Dunn, 1990b) (Klionsky & Emr, 2000) (Kim & Klionsky, 2000) (Petiot *et al.*, 2000) (Meijer & Codogno, 2004). Nach der Fusion mit dem Lysosom wird die äußere Membran des Autophagosoms in die Lysosomenmembran inkorporiert. Die nunmehr einfache innere Membran, der sog. autophagosomale Körper, wird in das Lysosomenlumen freigesetzt und mit Hilfe von Proteinase A (Pep4p) und B (Prb1p), Atg22p und den Lipasen Cvt17p und Atg15p abgebaut (Klionsky & Emr, 2000) (Kim & Klionsky, 2000) (Levine & Klionsky, 2004) (Ogier-Denis & Codogno, 2003) (Klionsky, 2005b) (Thompson & Vierstra, 2005).

Zwei Konjugationssysteme sind an der Bildung des Autophagosoms beteiligt.

Im ersten Konjugationssystem (Apg12-System) wird Apg12p mit Apg5p konjugiert: Der C-terminale Glycinrest von Apg12p wird durch das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym Apg7p mittels ATP-Hydrolyse durch Adenylierung aktiviert. Apg12p geht über eine Thioesterbrücke eine Verbindung mit Apg7p ein und wird dann auf das E2-Ubiquitin-Konjugationssystem Apg10p transferiert, die Verbindung wird ebenfalls durch eine Thioesterbrücke hergestellt. Schließlich wird Apg12p kovalent mittels einer Isopeptidbrücke an Apg5p (α-Aminogruppe) gebunden. Das Apg12p-Apg5p-Konjugat formt einen nicht-kovalenten Proteinkomplex mit Apg16p (350 kDa in Hefe, 800 kDa in Säugern). Es bilden sich meist Apg12p-Apg5p-Apg16p-Komplexe von hetero-oktomerer Struktur. Die Bildung des Apg12p-Apg5p-Konjugats ist für die Elongation der Isolationsmembran und damit für den Fortgang der Autophagie essentiell (Ohsumi, 2001) (Mizushima *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004) (Thompson & Vierstra, 2005).

Apg12 system

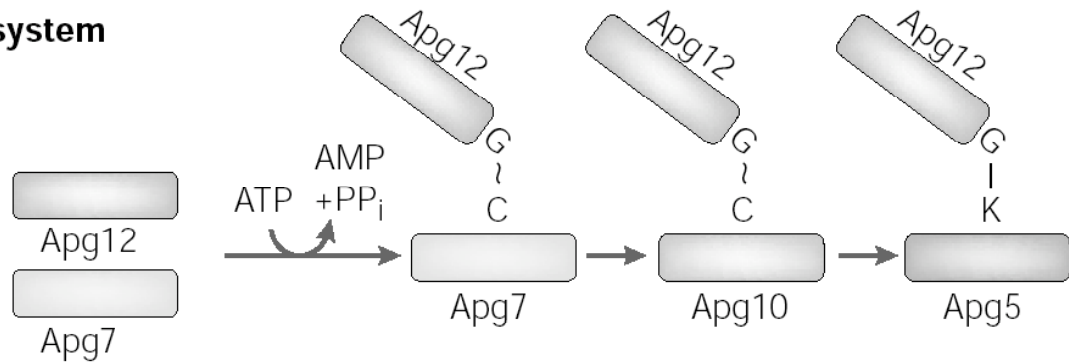


Abbildung 3: Das Apg12p-System. Nach (Ohsumi, 2001).

Im zweiten Konjugationssystem (Apg8-System) wird Apg8p mit dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin konjugiert: Erst wird der C-Terminus von Apg8p durch die Cystein-Protease Apg4p abgespalten, um einen Glycinrest zu exponieren. Dieses G116 wird durch das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym Apg7p mittels ATP-Hydrolyse durch Adenylierung aktiviert, anschließend wird Apg8p über eine Thioesterbrücke mit Apg7p konjugiert. Apg8p wird dann auf das E2-Ubiquitin-Konjugationsenzym Apg3p transferiert, wobei die Verbindung ebenfalls durch eine Thioesterbrücke hergestellt wird. Schließlich wird Apg8p über eine Amidbrücke an die Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) gebunden. Dieser Apg8p-PE Komplex lokalisiert über den Lipidteil an der Autophagosomenmembran und vermittelt die Membranelongation. Später wird Apg8p durch Apg4p von dem Phospholipidanker dekonjugiert. Der Zyklus von Konjugation und Dekonjugation ist für die normale Progression der Autophagie wichtig. Da Apg8p mit Mikrotubuli interagiert, wird vermutet, dass das Apg8p-PE-Konjugat beim Transport des Autophagosoms zum Lysosom über das Zusammenspiel mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett mitwirkt (Ohsumi, 2001) (Mizushima *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004) (Klionsky, 2005b) (Thompson & Vierstra, 2005).

c Apg8 system

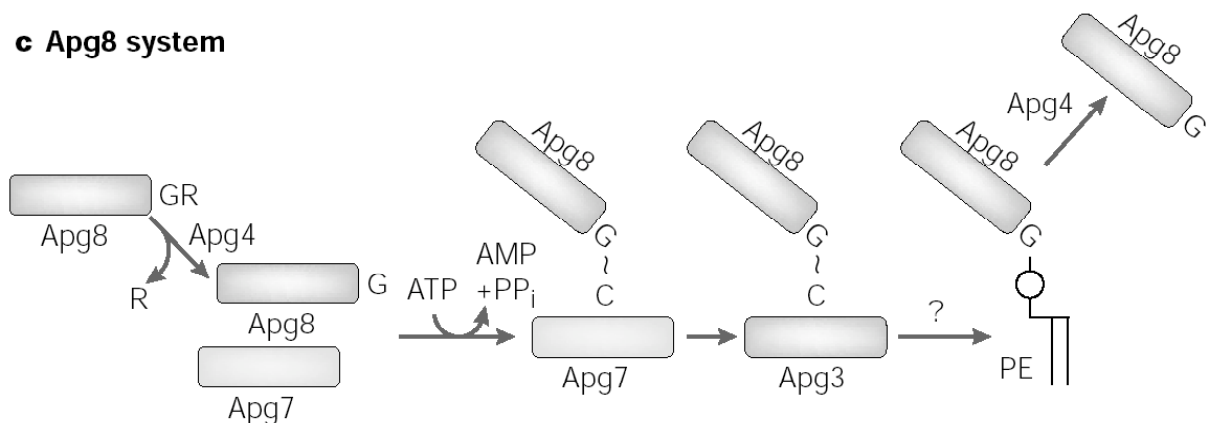


Abbildung 4: Das Apg8p-System. Nach (Ohsumi, 2001).

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten sechs autophagischen Kandidatengene beschrieben werden.

1.3.5.1 Beclin1p

Das humane Beclin1-Protein ist ein 63 kDa großes peripheres Membranprotein mit einer zentralen coiled-coil-Domäne. Es kann aufgrund einer kurzen nuklearen Exportsequenz zwischen Zellkern und Cytoplasma pendeln. Die Identität der Aminosäuren zwischen dem Hefeprotein Apg6p/Vps30p und dem humanen Beclin1p beläuft sich auf 24 %, die Konservierung auf 39 % (Liang *et al.*, 1998) (Liang *et al.*, 1999) (Klionsky & Emr, 2000) (Liang *et al.*, 2001) (Yue *et al.*, 2003) (Qu *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004) (Shimizu *et al.*, 2004) (Levine & Yuan, 2005). Das haploinsuffiziente Tumorsuppressorgen *BECLIN1* ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert. Eine heterozygote *BECLIN1*-Deletion führt zu einer erhöhten Proliferationsrate *in vivo* und steigert die Anzahl an spontanen Mutationen und Tumoren. Neben der Tumorrage steigen auch Tumorgöße und das Spektrum an verschiedenen Tumoren, es resultiert eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Yue *et al.*, 2003) (Qu *et al.*, 2003) (Shintani & Klionsky, 2004). Beclin1p besitzt antivirale Eigenschaften, es schützt Nervenzellen über die Bindung an Bcl-2p gegen Sindbis-Virusreplikation *in vivo* und Virus-induzierten programmierten Zelltod (Liang *et al.*, 1998) (Yu *et al.*, 2004) (Takacs-Vellai *et al.*, 2005). Der Klasse III PI3-Kinase-Komplex besteht aus PI3-Kinase, dem Membran-gebundenen Adapterprotein p150 (myristylierte Serin-Kinase) und der regulatorischen Untereinheit Beclin1p. Dieser Komplex rekrutiert als Teil des *Trans*-Golgi-Netzwerks andere autophagische Proteine z.B. das Apg12p-Apg5p-Konjugat und lysosomale Enzyme an die prä-autophagosomalen Strukturen (Klionsky & Emr, 2000) (Suzuki *et al.*, 2001) (Kihara *et al.*, 2001) (Tassa *et al.*, 2003) (Qu *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004) (Gozuacik & Kimchi, 2004).

1.3.5.2 Apg3p

Das humane Apg3p ist ein 45 kDa-Protein und zeigt 34 % Identität und 48 % Ähnlichkeit zum Hefe-Protein, vor allem die vermutete aktive Seite ist signifikant konserviert. Es ist ein für das Apg8p-PE-System spezifisches Konjugationsenzym, zeigt aber partielle Homologie zu Apg10p. Apg3p wird ubiquitär cytosolisch exprimiert mit besonders hohem Level in Herz, Skelettmuskel, Niere, Leber und Plazenta. Apg3p bildet einen E1-E2-Komplex mit Apg7p und interagiert mit freiem Apg12p, was die Bildung des Apg12p-Apg5p-Konjugates erleichtert und nachfolgend den Einbau der lipidierten Form von MAP1-LC3p in die Autophagosomenmembran fördert. Alle drei humanen Apg8p-Homologe (MAP1-LC3p, GATE-16p,

GABARAPp) sind Substrate von Apg3p, wobei die Affinität zu MAP1-LC3p am höchsten ist (Tanida *et al.*, 2002b) (Tanida *et al.*, 2002a) (Mizushima *et al.*, 2003).

1.3.5.3 Apg4p

Die vier humanen Apg4p-Homologe bilden die Familie der sog. Autophagine (Apg4Ap/Autophagin-2, Apg4Bp/Autophagin-1, Apg4Cp/Autophagin-3 und Apg4Dp/Autophagin-4), die als Cysteinproteasen in die Autophagie involviert sind.

APG4B/Autophagin-1 befindet sich auf Chromosom 2q37, das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 44,4 kDa. Es ist ein konstitutiv exprimiertes, lösliches, cytoplasmatisches Protein, das vorwiegend in Herz, Leber und Pankreas gefunden wird. Apg4Bp ist die spezifische Protease, die alle Apg8p-Homologe (MAP1-LC3p, GATE-16p, GABARAPp und Apg8Lp) prozessiert und dekonjugiert. Beim Processing beseitigt Apg4Bp das C-terminale Arginin des Apg8p-Vorläuferproteins, das Ergebnis dieser proteolytischen Spaltung ist ein reifes Apg8-Protein mit einem exponierten C-terminalen Glycinrest, die Voraussetzung für die Modifikationsreaktionen von Apg7p und Apg3p. Bei der Dekonjugation wird die Amidbrücke zwischen Apg8p und Phosphatidylethanolamin getrennt, wodurch Apg8p aus der Membran freigesetzt wird und die Membranassoziation von Apg8p zu einem reversiblen Prozess gemacht wird (Suzuki *et al.*, 2001) (Ohsumi, 2001) (Hemelaar *et al.*, 2003) (Kumanomidou *et al.*, 2006). *APG4C*/Autophagin-3 ist auf Chromosom 1p31 lokalisiert, als Molekulargewicht ist 152,1 kDa angegeben. Apg4Cp wird in vielen Geweben, aber hauptsächlich in Skelettmuskel, Herz, Leber und Testis gefunden. Humanes *APG4B* und *APG4C* sind in der Lage, einen Autophagie-Defekt in *APG4*-defizienten Hefen zu komplementieren (Marino *et al.*, 2003) (Hemelaar *et al.*, 2003) (Meijer & Codogno, 2004).

1.3.5.4 Apg5p

Humanes Apg5p ist ein hydrophiles Protein von 34 kDa, das mit Apg12p einen Komplex bildet. Die Interaktion zwischen Apg5p, Apg12p und Apg16p ist für die richtige Lokalisierung von Apg5p und Apg8p in der prä-autophagosomalen Membran notwendig. Ein Teil des Apg5p und des Apg12p-Apg5p-Konjugats ist an der Außenseite der Isolationsmembran assoziiert, während der Großteil des Apg5p diffus im Cytosol verteilt ist. Nach Fertigstellung des Autophagosoms dissoziiert der Apg12p-Apg5p-Apg16p-Komplex von der Membran. Das humane Apg5p-Homolog wird während der Apoptose stark exprimiert (George *et al.*, 2000) (Klionsky & Emr, 2000) (Suzuki *et al.*, 2001) (Mizushima *et al.*, 2003) (Mizushima, 2004) (Gozuacik & Kimchi, 2004).

1.3.5.5 Apg12p

Apg12p ist ein hydrophiles Protein mit 186 Aminosäuren, es wurde als Ubiquitin-artiges Protein identifiziert. Fast alle Apg12p-Moleküle in der Zelle befinden sich in der konjugierten Form. Die Apg12p-Apg5p-Konjugation ist konstitutiv und wird nicht durch die Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst (Klionsky & Emr, 2000) (Ohsumi, 2001) (Suzuki *et al.*, 2001) (Tanida *et al.*, 2002b) (Mizushima *et al.*, 2003).

1.3.6 RNAi als Technik zur Geninhibition

Traditionelle forward Genetik-Screens beginnen mit der Isolierung von Mutanten, bei denen ein Aspekt der zellulären Funktion oder Entwicklung defekt ist, darauf folgt die molekulare Identifikation des Gens, das diesen Defekt verursacht. Früher war die Identifizierung mutanter Phänotypen wesentlich schneller, als das zugrunde liegende Gen kloniert werden konnte. Seit heutzutage Genome komplett sequenziert sind, übertrifft die Anzahl bekannter Sequenzen die Anzahl bekannter Genfunktionen. In der reversen Genetik will man von der Gensequenz auf die Genfunktion schließen. RNA interference (RNAi) ist eine neue und schnelle Technologie, die reverse Genetik an Pflanzen, Würmern, Fliegen und kultivierten Säugerzellen mittels siRNA erlaubt (Zamore, 2001).

Der Term RNA interference (RNAi) beschreibt den Gebrauch doppelsträngiger RNA, um sequenzspezifische mRNAs zur Degradation zu markieren und damit ihre Expression posttranskriptional zum Schweigen zu bringen. Das RNAi-Phänomen wird durchweg in allen Eukaryoten gefunden. Man nimmt an, dass der RNAi-Maschinerie eine sehr wichtige biologische Funktion in der Regulierung und der Expression des Genoms zukommt. Dieser Mechanismus dient dem Schutz des Genoms vor viralen oder parasitären DNA-Sequenzen und der Erhaltung der Genomintegrität und -stabilität, indem die Mobilisierung von Transposons und die Akkumulation repetitiver DNA in der Keimbahn unterdrückt werden (Hammond *et al.*, 2001) (Zamore, 2001) (Elbashir *et al.*, 2001) (Wall & Shi, 2003) (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003).

In Säugerzellen wird RNAi durch Transfektion von 19-23 Nukleotid-langen dsRNAs, die komplementär zur mRNA eines vorgegebenen Zielgens sind, erreicht. Die RNAi-Maschinerie nutzt die Sequenzinformation der dsRNA, um einen Protein-RNA-Komplex zu bilden, der die entsprechende Ziel-mRNA spezifisch zerstört. Die siRNA wird in einen cytoplasmatischen Protein-RNA-Komplex (RISC, RNA-induced silencing complex) inkorporiert, mit dessen Hilfe sie eine Nuklease zur Ziel-mRNA dirigiert. Der RISC besteht aus einer Helikase, einer Exo- und einer Endonuklease und einem RecA-Protein. Das RecA-Protein sucht nach homo-

logen RNA-Sequenzen. Der Antisense-Strang scheint für das Silencing besonders kritisch zu sein, da er mit dem Sense-Transkript der Ziel-mRNA hybridisiert. Die Ziel-mRNA wird in der Mitte der von der siRNA umfassenden Region gespalten (Hammond *et al.*, 2001) (Zamore, 2001) (Martinez *et al.*, 2002).

In Pflanzen, Würmern und Fliegen reichen nur einige dsRNA-Moleküle pro Zelle aus, um tausende von Ziel-mRNAs zu hemmen. Die dsRNA dient als Katalysator oder wird amplifiziert (Zamore, 2001) (Wall & Shi, 2003). In Säugern fehlt dieser Amplifizierungsmechanismus, die siRNA-induzierte Gen-Inhibition ist transient. Dennoch sind siRNAs extrem starke Reagenzien für Gen-Silencing, die auch in sehr geringer Konzentration effektiv sind (Elbashir *et al.*, 2001). Transfektionssysteme bestehen aus kationischen Polymeren und Lipiden (Polyplexe, Lipoplexe und Lipopolyplexe). Die kationischen Reagenzien sind keine Proteine, besitzen daher von Natur aus kaum Immunogenität und machen eine wiederholte Applikation möglich. Durch eine Kondensation mit der Nukleinsäure machen sie diese gegenüber Nuklease-Abbau resistent (Sheikh *et al.*, 2003).

1.4 Zielsetzung

Die Beeinflussung des lysosomalen Kompartiments bzw. seiner Funktionen soll in zwei unterschiedlichen Systemen, einem pilzlichen und einem humanen, erforscht werden.

Zum einen wird der Einfluss der Pilz-Vakuole und ihrer Funktion auf die Virulenz von *Candida albicans* untersucht werden. Dazu werden zehn Gene ausgewählt, deren Funktion in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist. Dort kodieren sie für vakuoläre Proteine, die an der Membranfusion von Vakuolen beteiligt sind. Dadurch beeinflussen sie die Vakuolenmorphologie und Vakuolenfunktion, aber nicht die Lebensfähigkeit der Hefestämme. Die Gene *CaNYV1*, *CaVAC8*, *CaVAM3*, *CaVAM7*, *CaVPS33*, *CaVPS41*, *CaVTC1*, *CaVTC3/2*, *CaVTC4* und *CaYPT7* werden in *Candida albicans* deletiert und die Deletionsmutanten auf ihre Vakuolenmorphologie und Fähigkeit zur Hyphenbildung untersucht. Die Stämme werden auch im Mausmodell für systemische Candidosis auf ihre Virulenz hin getestet.

Zum anderen wird die Beeinflussung der Autophagie auf die Strahlenreaktion humaner Tumoren untersucht, denn die in der Tumorthherapie verwendete ionisierende Bestrahlung induziert Autophagie als Schutz vor Strahlenschäden und apoptotischem Zelltod. Dazu werden sechs autophagische Kandidatengene (*BECLIN1*, *APG3*, *APG4B*, *APG4C*, *APG5* und *APG12*) ausgewählt, die mittels siRNA in kultivierten Tumorzellen gehemmt werden sollen. Die Effizienz dieser Methode wird auf RNA- und Protein-Ebene überprüft. Die Fähigkeit transfizier-

ter und bestrahlter Zellen, Autophagie zu induzieren, wird elektronenmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch getestet. Um Aussagen über eine potentielle und effektive Radiosensitivierung zu erhalten, soll als funktioneller Endpunkt die Beeinflussung des klonogenen Zellüberlebens nach Bestrahlung mit und ohne Hemmung autophagischer Gene ermittelt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen

Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, in Analyse-Qualität von Roth (Karlsruhe, Germany), Sigma (Taufkirchen, Germany) oder Merck (Darmstadt, Germany) bezogen. Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert. Für genetische und molekularbiologische Techniken wurden sterilisierte Pipettenspitzen, Polyethylen- und Glasgefäße verwendet. Die Experimente wurden in silikonisierten PE-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Materialien nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Hefe- und Bakterien-Medienkomponenten wurden von Becton Dickinson Microbiology Systems (Heidelberg, Germany) bezogen. Aminosäuren wurden von Serva (Heidelberg, Germany) und Ampicillin von Roth (Karlsruhe, Germany) verwendet. Restriktionsenzyme, CIP (Calf Intestinal Phosphatase), T4-DNA-Ligase und 1kb-Ladder wurden von der Firma New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) bezogen. *Taq*-DNA-Polymerase, Deoxy-Nukleotide und Wizard[®] PCR Preps DNA Purificationsysteme wurden bei Promega (Mannheim, Germany) erworben. *Pwo*-DNA-Polymerase wurde bei PEQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Germany) bezogen. PCR-Primer wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany) hergestellt. Plasmide wurden mit dem von QIAprep Spin Plasmid Miniprep-Kit von QIAGEN GmbH (Hilden, Germany) gereinigt. DNA wurde mit Hilfe des DNA Extraction Kit von Millipore (Schwalbach, Germany) aus Agarosegelen aufgereinigt.

YPD-Vollmedium: 20 g/l Bactopepton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 20 g/l Glucose. Für Agarplatten wurde Agarose ad 20 g/l zugesetzt.

LB-Medium (Lennox-Medium): 10 g/l Bactopepton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl. Für Agarplatten wurde Agarose ad 10 g/l zugesetzt.

HC-Stock (Hartwell's Complete): 0,2 g/l Methionin, 0,6 g/l Tyrosin, 0,8 g/l Isoleucin, 0,5 g/l Phenylalanin, 1 g/l Glutaminsäure, 2 g/l Threonin, 1 g/l Asparaginsäure, 1,5 g/l Valin, 4 g/l Serin, 0,2 g/l Arginin.

HC-Selektionsmedium (Hartwell's Complete): 100 ml HC-stock, 100 ml YNB, 100 ml Glucose (200 g/l), 20 ml Adenin (1 g/l), 12 ml Lysin (10 g/l), 8 ml Tryptophan (10 g/l), 4 ml Leucin (20 g/l), 2 ml Histidin (10 g/l) ad 1 l mit H₂O deion. Je nach Selektionswunsch Zusatz von 35 ml Uracil (1 g/l).

HC-Agarplatten: 10 g Agar, 350 ml H₂O, 50 ml 20 % Glucose, 50 ml 10x YNB-Stock, 50 ml 10 x HC.

HC-URA-Agarplatten: 10 g Agar, 350 ml H₂O, 50 ml 20 % Glucose, 50 ml 10x YNB-Stock, 50 ml 10 x HC-URA.

Ampicillin: 100 mg/ml in H₂O bidest.

10 x TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA.

Lysepuffer (DNA-Isolierung): 1 M Sorbitol, 100 mM NaCitrat pH 5,8, 50 mM EDTA pH 8,0, 2 % β -Mercaptoethanol, 500 Units/ml Oxalyticase (Enzogenetics, Corvallis, OR, USA).

Proteinase-Puffer (DNA-Isolierung): 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM EDTA pH 7,5, 0,5 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K.

TE/RNaseA-Puffer (DNA-Isolierung): 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 mg/ml RNase A.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1.

Chloroform/Isoamylalkohol 24:1.

10 x Ladepuffer für Agarosegel: 20 % Ficoll 400, 0,1 M Na₂EDTA pH 8,0, 1 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenecyanol.

50 x TAE-Puffer: 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 252 g Tris, 57,1 ml Eisessig, ad 1 l mit H₂O bidest.

10 x TBE-Puffer : 108 g Tris base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, ad 1 l mit H₂O bidest.

20 x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0.

DMEM-Zellkulturmedium (Dulbecco`s modified Eagle Medium): 12,04 g DMEM Trockenmedium, 3,3 g NaHCO₃, ad 900 ml H₂O bidest., pH 7,0. Zugabe von 100 ml FBS pro 1 Liter (= 10 %).

10 x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,1.

Lysepuffer für Proteinextraktion: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM β -Glycerophosphat, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) Twen-20, 1 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, Complete-Protease-Inhibitormix (40 μ l/ml; Roche, Penzberg, Germany).

5 % SDS-Sammelgel (6,1 ml): 1,0 ml AMBA (Acrylamid/Bisacrylamid 30:1), 0,6 ml 0,6 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4 ml H₂O bidest., 60 μ l 10 % SDS, 10 μ l TEMED, 30 μ l 10 % APS.

12,5 % SDS-Trenngel (17 ml): 7,1 ml AMBA (Acrylamid/Bisacrylamid 30:1), 4,32 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 5,3 ml H₂O bidest., 170 μ l 10 % SDS, 10 μ l TEMED, 100 μ l 10 % APS.

14 % SDS-Trenngel (17 ml): 7,9 ml AMBA (Acrylamid/Bisacrylamid 30:1), 4,32 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 4,5 ml H₂O bidest., 170 μ l 10 % SDS, 10 μ l TEMED, 100 μ l 10 % APS.

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer: 30 g Tris base, 144 g Glycin, 10 g SDS, ad. 1 l H₂O bidest.

4 x Lämmli-Ladepuffer für SDS-Gele: 240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8 % SDS, 40 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau, 20 % β -Mercaptoethanol.

Blotpuffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris base, 0,0375 % SDS, 20 % Methanol.

MoWiol: 30g Glycerin, 12 g MoWiol, 30 ml H₂O bidest., 60 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5.

0,05 % Coomassie-Lösung: 20 % Methanol, 7,5 % Eisessig, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg, Germany).

2.2 Versuche mit *Candida albicans*

2.2.1 Stämme und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten oder hergestellten *Candida albicans*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten *Candida albicans*-Stämme.

Stamm	Charakterisierung	Referenz
SC5314	Wildtypstamm	Gillum et al. (1984)
CAI4	SC5314 Derivat, $\square_{ura3::imm434}/\square_{ura3::imm434}$	Fonzi and Irwin (1993)
CANYV1S	$nyv1::nyv/nyv1::URA3-FLIP^a$	Diese Arbeit
CANYV1R	$nyv1::nyv1/nyv1::FRT^b$	Diese Arbeit
CANYV1D	$nyv1::FRT/nyv1::URA3^c$	Diese Arbeit
CANYV1F	$nyv1::FRT/nyv1::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CANYV1H	$nyv1::FRT/nyv1::FRT$	Diese Arbeit
CAVAC8S	$vac8::vac8/vac8::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVAC8R	$vac8::vac8/vac8::FRT$	Diese Arbeit
CAVAC8D	$vac8::FRT/vac8::URA3$	Diese Arbeit
CAVAC8F	$vac8::FRT/vac8::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVAC8H	$vac8::FRT/vac8::FRT$	Diese Arbeit
CAVAM3S	$vam3::vam3/vam3::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVAM3R	$vam3::vam3/vam3::FRT$	Diese Arbeit
CAVAM3D	$vam3::FRT/vam3::URA3$	Diese Arbeit
CAVAM3F	$vam3::FRT/vam3::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVAM3H	$vam3::FRT/vam3::FRT$	Diese Arbeit
CAVAM3Re	$vam3::FRT/vam3::vam3+URA3^d$	Diese Arbeit
CAVAM7S	$vam7::vam7/vam7::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVAM7R	$vam7::vam7/vam7::FRT$	Diese Arbeit
CAVAM7D	$vam7::FRT/vam7::URA3$	Diese Arbeit
CAVAM7F	$vam7::FRT/vam7::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVAM7H	$vam7::FRT/vam7::FRT$	Diese Arbeit
CAVPS33S	$vps33::vps33::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVPS33R	$vps33::vps33/vps33::FRT$	Diese Arbeit
CAVPS33D	$vps33::FRT/vps33::URA3$	Diese Arbeit
CAVPS33F	$vps33::FRT/vps33::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVPS41S	$vps41::vps41/vps41::URA3-FLIP$	Diese Arbeit
CAVPS41R	$vps41::vps41/vps41::FRT$	Diese Arbeit
CAVPS41D	$vps41::FRT/vps41::URA3$	Diese Arbeit

CAVPS41F	<i>Vps41::FRT/vps41::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC1S	<i>vtc1::vtc1/vtc1::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC1R	<i>vtc1::vtc1/vtc1::FRT</i>	Diese Arbeit
CAVTC1D	<i>vtc1::FRT/vtc1::URA3</i>	Diese Arbeit
CAVTC1F	<i>vtc1::FRT/vtc1::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC1H	<i>vtc1::FRT/vtc1::FRT</i>	Diese Arbeit
CAVTC3/2S	<i>vtc3/2::vtc3/2/vtc3/2::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC3/2R	<i>vtc3/2::vtc3/2/vtc3/2::FRT</i>	Diese Arbeit
CAVTC3/2D	<i>vtc3/2::FRT/vtc3/2::URA3</i>	Diese Arbeit
CAVTC3/2F	<i>vtc3/2::FRT/vtc3/2::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC3/2H	<i>vtc3/2::FRT/vtc3/2::FRT</i>	Diese Arbeit
CAVTC4S	<i>vtc4::vtc4/vtc4::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC4R	<i>vtc4::vtc4/vtc4::FRT</i>	Diese Arbeit
CAVTC4D	<i>vtc4::FRT/vtc4::URA3</i>	Diese Arbeit
CAVTC4F	<i>vtc4::FRT/vtc4::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAVTC4H	<i>vtc4::FRT/vtc4::FRT</i>	Diese Arbeit
CAYPT7S	<i>ypt7::ypt7/ypt7::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAYPT7R	<i>ypt7::ypt7/ypt7::FRT</i>	Diese Arbeit
CAYPT7D	<i>ypt7::FRT/ypt7::URA3</i>	Diese Arbeit
CAYPT7F	<i>ypt7::FRT/ypt7::URA3-FLIP</i>	Diese Arbeit
CAYPT7Re	<i>ypt7::FRT/ypt7::ypt7+URA3^d</i>	Diese Arbeit

a: *URA3-FLIP* beinhaltet die *FRT* - *SAP2* Promoter - *FLP* Rekombinase - *URA3* - *FRT*-Kassette, den sog. *URA3*-Flipper.

b: *FRT* steht für eine *FRT*-Seite, die nach Entfernung der *URA3*-Flipper-Kassette durch die *FLP*-Rekombinase im Genom bleibt.

c: *URA3* meint das *URA3*-Markergen.

d: *vam3+URA3* bzw. *ypt7+URA3* beschreibt ein Fusionskonstrukt aus dem betreffenden Wildtypgen und dem *URA3*-Markergen.

Die Stämme wurden auf YPD- oder HC-Agarplatten ausgestrichen. Die Selektion der Deletionsmutanten erfolgte mit HC-Agarplatten und entsprechenden HC-URA-Replikaplaten (Minimal drop-out). Einzelkolonien wurden in YPD-Medium mit oder ohne Zusatz von Uridin (100 µg/ml) als Flüssigkulturen angezogen (200 rpm, 30 °C). Von allen Stämmen wurden Dauerkulturen in 15 % Glycerin hergestellt, die bei -80 °C gehalten wurden.

2.2.2 Herstellung der Deletionskassetten

Als Hintergrundstamm für alle Deletionsmutanten diente der Uracil-auxotrophe Stamm CAI4. Da *Candida albicans* ein diploides Genom besitzt, mussten zwei Allele ersetzt werden. Die Gensubstitution musste sequenziell erfolgen, da der *URA3*-Marker bisher als einziger Selektionsmarker in *Candida albicans* etabliert ist. Die 3'-UTRs und 5'-UTRs aller 10 ausgewählten

Gene wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern aus genomischer DNA amplifiziert.

Tabelle 2: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung der 3'-UTRs und 5'-UTRs ^a.

Name	Sequenz	Charakterisierung
Nyv1.1	5'-TGA <u>TGG TAC CTT</u> TGC TCG AGA CAT TTT CTC C-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>NYV1</i> 5'-UTR (700bp)
Nyv1.2	5'-TGA TGG GCC CTT GAA GGC GGG GAA TGG TTA-3'	
Nyv1.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> AAT CA TAT ATA GTG TTA CT-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>NYV1</i> 3'-UTR (700bp)
Nyv1.4	5'-TGA <u>TGA GCT CCT</u> AGC CAA GAA TAT AAT ATC-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>NYV1</i> 3'-UTR (700bp)
Vac8.1	5'-TGA <u>TGG TAC CTC</u> TTT GTC TTT TTT TTA GGT C-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 5'-UTR (700bp)
Vac8.1a	5'-TGA <u>TGG TAC CCT</u> GTT GTC GTG TTT ATT AAC T-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 5'-UTR (700bp)
Vac8.1b	5'-TGA <u>TGG TAC CGG</u> GCG ACA AGT TTC ATA ATC-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 5'-UTR (700bp)
Vac8.2	5'-TGA <u>TCT CGA GTT</u> TGA TAT CTT CTT GAT TGT-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 5'-UTR (700bp)
Vac8.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> AGA GAA AGG ACC AAC AGT TC-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 3'-UTR (700bp)
Vac8.3a	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> ACC AAC AGT TCT AAG TGG GA-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 3'-UTR (700bp)
Vac8.3b	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> TCT TAC AAA TAT TAG GAT GA-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 3'-UTR (700bp)
Vac8.3c	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> CTA ATT TAC TAT AGG TTC AG-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 3'-UTR (700bp)
Vac8.4	5'-TGA <u>TGA GCT CAA</u> TAT TTT AGT TAA AAT TAA TG-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 3'-UTR (700bp)
Vac8.4a	5'-TGA <u>TGA GCT CAG</u> TTA AAA TTA ATG ATT CAG-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VAC8</i> 3'-UTR (700bp)
Vam3.1	5'-TGA <u>TGG TAC CGA</u> AGT CAT TCT CCA ACT TGC T-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VAM3</i> 5'-UTR (700bp)
Vam3.2	5'-TGA <u>TCT CGA GTA</u> TAT GAT TAG TCA AAA ATT TGT GC-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VAM3</i> 5'-UTR (700bp)
Vam3.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> ATT AAT AGA CAA CGT TGG TG-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VAM3</i> 3'-UTR (700bp)
Vam3.4	5'-TGA <u>TGA GCT CAA</u> CTA TAC ATA AGA AAT CTG-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VAM3</i> 3'-UTR (700bp)
Vam7.1	5'-TGA <u>TGG TAC CTT</u> ACC TTC TTC AAC CCA ATA-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VAM7</i> 5'-UTR (700bp)

Vam7.2	5'-TGA <u>TCT CGA GTG</u> GTT ATA GTG TTA AAA AGA-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VAM7</i> 5'-UTR (700bp)
Vam7.3	5'-TGA TGC GGC CGG TAA TTT GTT CAC TAC TTC GAT-3'	
Vam7.4	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> AAT AAG ACG ACG TAT TTG GG-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VAM7</i> 3'-UTR (700bp)
Vps33.1	5'-TGA <u>TGG TAC CGC</u> TGA ACG TAG ATT GAC AGC A-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VPS33</i> 5'-UTR (700bp)
Vps33.2	5'-TGA <u>TCT CGA GGT</u> TTT TCT GTA ATT GAA GAG-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VPS33</i> 5'-UTR (700bp)
Vps33.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> ATA GTA ACA AAA GAA GAA CA-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VPS33</i> 3'-UTR (700bp)
Vps33.4	5'-TGA TG GCT <u>CGA GCT CTT</u> CTA TTC TCA ATT T-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VPS33</i> 3'-UTR (700bp)
Vps41.1	5'-TGA TGG GCC CAA ATA CGT ATA GAA AAT CTT-3'	
Vps41.2	5'-TGA <u>TCT CGA GTA</u> GTT TGG CAA GGT GAT TGA-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VPS41</i> 5'-UTR (700bp)
Vps41.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> CTA TAT TAC AGA GGA TGC CA-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VPS41</i> 3'-UTR (700bp)
Vps41.4	5'-TGA <u>TGA GCT CAA</u> CAA TAC AAT TAT TAA TGG A-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VPS41</i> 3'-UTR (700bp)
Vtc1.1	5'-TGA <u>TGG TAC CAC</u> TTG TTT CCA TTA CTT GTC-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VTC1</i> 5'-UTR (700bp)
Vtc1.2	5'-TGA <u>TCT CGA GGG</u> TGG TTA GGA AAA AAA TGT-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VTC1</i> 5'-UTR (700bp)
Vtc1.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> TGT GTAGCC CCC CTC CAA AA-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VTC1</i> 3'-UTR (700bp)
Vtc1.4	5'-TGA <u>TGA GCT CGC</u> ACA ACC GAT AAC AAC GAT-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VTC1</i> 3'-UTR (700bp)
Vtc3/2.1	5'-TGA <u>TGG TAC CAT</u> ATT CAT ATG ATC ATC TTC T-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VTC3/2</i> 5'-UTR (700bp)
Vtc3/2.2	5'-TGA <u>TCT CGA GCT</u> TTG TTT CAC TTG AAG AAG G-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VTC3/2</i> 5'-UTR (700bp)
Vtc3/2.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> AGT TTA TTA CAT TTG AAT ATT T-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VTC2/3</i> 3'-UTR (700bp)
Vtc3/2.4	5'-TGA <u>TGA GCT CTT</u> ATC AAC AGT ATT ATC CAA T-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VTC2/3</i> 3'-UTR (700bp)
Vtc4.1	5'-TGA <u>TGG TAC CTC</u> AAT TAT TAT TAT ACA CGT T-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>VTC4</i> 5'-UTR (700bp)
Vtc4.2	5'-TGA <u>TCT CGA GTG</u> CTT AAA TAA ATA TAG AAA G-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>VTC4</i> 5'-UTR (700bp)
Vtc4.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> TAT CAC TGG TTC TAG TAT AG-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>VTC4</i> 3'-UTR (700bp)
Vtc4.4	5'-TGA <u>TGA GCT CGA</u> ATC CAC AAT CGA TTT CGG G-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>VTC4</i> 3'-UTR (700bp)

Ypt7.1	5'-TGA <u>TGG TAC CAT</u> AAA ATA TGT TAT ATT TGA G-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 5'-UTR (700bp)
Ypt7.1a	5'-TGA <u>TGG TAC CGA</u> GTA TAA ATT GTA GAT CGT-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 5'-UTR (700bp)
Ypt7.1b	5'-TGA <u>TGG TAC CGA</u> CAT TCA ATA ATG GGA AAT CAA C-3'	KpnI site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 5'-UTR (518bp)
Ypt7.2	5'-TGA <u>TCT CGA GTG</u> AAA ATT AAG TGT ATA TGA-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 5'-UTR (700bp)
Ypt7.2a	5'-TGA <u>TCT CGA GTC</u> TAG ATG ATG ATG ACA TTG-3'	XhoI site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 5'-UTR (518bp)
Ypt7.3	5'-GTT GAT <u>CCG CGG</u> TAA TAT AAC AAT CAA TTT CAA ATA-3'	SacII site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 3'-UTR (700bp)
Ypt7.4	5'-TGA TGA <u>GCT CTT</u> AGC TCA AGC TGA AGA ATG-3'	SacI site, Amplifizierung der <i>YPT7</i> 3'-UTR (700bp)

a: Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Durch die Primer wurden während der PCR Restriktionsschnittstellen in die Fragmente eingeführt. Über diese Schnittstellen konnten die PCR-Fragmente in die Klonierungsstellen (MCS) vor und hinter die *URA3*-Flipper-Kassette des Plasmids pSFU1 (Morschhäuser *et al.*, 1999) kloniert werden. Die resultierenden Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Plasmide für die intrachromosomale Rekombination zur Einführung der *URA3*-Flipper-Kassette.

Name	Charakterisierung
pNYV1ko	<i>NYV1</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>NYV1</i> 3'-UTR
pVAC8ko	<i>VAC8</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VAC8</i> 3'-UTR
pVAM3ko	<i>VAM3</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VAM3</i> 3'-UTR
pVAM7ko	<i>VAM7</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VAM7</i> 3'-UTR
pVPS33ko	<i>VPS33</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VPS33</i> 3'-UTR
pVPS41ko	<i>VPS41</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VPS41</i> 3'-UTR
pVTC1ko	<i>VTC1</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VTC1</i> 3'-UTR
pVTC3/2ko	<i>VTC3/2</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VTC3/2</i> 3'-UTR
pVTC4ko	<i>VTC4</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>VTC4</i> 3'-UTR
pYPT7ko	<i>YPT7</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette – <i>YPT7</i> 3'-UTR

Für eine Deletionskassette ohne *FLP*-Rekombinase wurde das Xho I/Sal I-Fragment durch Doppelrestriktionsverdau entfernt und das Plasmid religiert. Die Plasmide, die zur dauerhaften Integration des *URA3*-Gens verwendet wurden, zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Plasmide für die intrachromosomale Rekombination zur Einführung eines stabilen *URA3*-Markergens.

Name	Charakterisierung
pNYV1koURA	<i>NYV1</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>NYV1</i> 3'-UTR
pVAC8koURA	<i>VAC8</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VAC8</i> 3'-UTR
pVAM3koURA	<i>VAM3</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VAM3</i> 3'-UTR
pVAM7koURA	<i>VAM7</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VAM7</i> 3'-UTR
pVPS33koURA	<i>VPS33</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VPS33</i> 3'-UTR
pVPS41koURA	<i>VPS41</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VPS41</i> 3'-UTR
pVTC1koURA	<i>VTC1</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VTC1</i> 3'-UTR
pVTC3/2koURA	<i>VTC3/2</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VTC3/2</i> 3'-UTR
pVTC4koURA	<i>VTC4</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>VTC4</i> 3'-UTR
pYPT7koURA	<i>YPT7</i> 5'-UTR – <i>URA3</i> – <i>YPT7</i> 3'-UTR

Um in den Virulenzexperimenten den Knock-out-Effekt der Deletionsmutanten zu revertieren, wurde das Wildtypgen zusammen mit dem *URA3*-Markergen in die homozygoten Deletionsmutanten wieder eingeführt. Die Wiedereinführung der Wildtypgene in die Deletionsmutanten war nur für *CaVAM3* und *CaYPT7* notwendig. Die Plasmide für diesen Schritt zeigt Tabelle 5.

Zur Konstruktion dieser Kassetten wurde das *URA3*-Gen mit Hilfe der Restriktionsenzyme Sall und PstI aus dem Plasmid pSFU1 ausgeschnitten und die überhängenden Enden zu stumpfen Enden umgewandelt. Das *CaVAM3*-Wildtypgen wurde mit den Primern vam3.1/vam3.4, das *CaYPT7*-Wildtypgen mit den Primern ypt7.1b/ypt7.4 (Tabelle 2) mittels PCR amplifiziert und über die KpnI/SacI-Schnittstellen in den Hintergrund des pSFU1-Plasmids eingefügt. Daraus resultierten die Plasmide pVAM3gen bzw. pYPT7gen. Das Plasmid pVAM3gen wurde an seiner einzigen EcoRI-Schnittstelle gespalten, die im *CaVAM3* 3'-UTR 328 bp nach dem STOP-Codon liegt und mit dem vorbehandelten *URA3*-Gen ligiert. Das führte zum Plasmid pVAM3rev. Das Plasmid pYPT7gen wurde an der einzigen EcoRV-Schnittstelle gespalten, die sich im *CaYPT7* 3'-UTR 51 bp nach dem STOP-Codon befindet. Die Ligation mit dem präparierten *URA3*-Gen resultierte im Plasmid pYPT7rev. Die Orien-

tierung des *URA3*-Gens wurde in beiden Plasmiden durch Restriktionsverdau überprüft. In beiden Plasmiden ist das *URA3*-Markergen in 3'→5'-Richtung in die Kasette eingefügt.

Tabelle 5: Plasmide für die intrachromosomale Rekombination zur Einführung des Wildtypgens zusammen mit dem *URA3*-Markergen.

Name	Charakterisierung
pVAM3rev	<i>VAM3</i> 5'-UTR – <i>VAM3</i> – <i>URA3</i> – <i>VAM3</i> 3'-UTR
pYPT7rev	<i>YPT7</i> 5'-UTR – <i>YPT7</i> – <i>URA3</i> – <i>YPT7</i> 3'-UTR

Um genetische Mutationen wie Leserasterverschiebungen durch Deletion oder Insertion auszuschließen, wurden die Plasmide nach der Kettenabbruchmethode (Dye-Terminatoren) sequenziert. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung.

Name	Sequenz
Nyv1.seq1	5'-TTG TGA TTG CTG TCA CCA AC-3'
Nyv1.seq2	5'-AGT GAG ACA GTT AAT GTT GG-3'
Nyv1.seq3	5'-AGC CAC TAA ATT CTG CTC-3'
Vac8.seq1	5'-TGA TGA GCT CAA TAT TTT AGT TAA AAT TAA TG-3'
Vam3.seq1	5'-ATT GTT GAT AAA TTT CCT AA-3'
Vam3.seq2	5'-CAA GTT CAA ACA CAA GTT GAC-3'
Vam3.seq3	5'-AAT ACT CAG CTC CTC TCG TGA-3'
Vam7.seq1	5'-GTT GAT CCG CGG AAT AAG ACG ACG TAT TTG GG-3'
Vps33.seq1	5'-AAT GAA CTT CTA CAT TTA GT-3'
Vps33.seq2	5'-TTA ATG GAA TTG ACG ATT ATT-3'
Vps33.seq3	5'-GTT GCC AAG CTT AGA GAG T-3'
Vps41.seq1	5'-TGC ATT TTC AAG AAC CTT GT-3'
Vtc1.seq1	5'-TGT AGT AAT GCG GCT CTC AC-3'
Vtc1.seq2	5'-TAC CAG TAT ATA ATT GGC GAC-3'
Vtc1.seq3	5'-CCA GCA CCA CAA ATC GTA CGA C-3'
Vtc3/2.seq1	5'-CTC CCC TCT ATA TTC AC-3'
Vtc3/2.seq2	5'-GGA TCC ATC CAG ACA ATT TGA-3'
Vtc3/2.seq3	5'-AAT TAA CTC ATC TTA TTT GGT TA-3'
Vtc3/2.seq4	5'-GAG AGA TCT GAT AAG CAT TTG G-3'
Vtc4.seq1	5'-TGA TGA GCT CGA ATC CAC AAT CGA TTT CGG G-3'

Für die Transformation von *Candida albicans* mittels Elektroporation wurden alle verwendeten Plasmide mit Kpn I/Sac I geschnitten und die gewünschten Fragmente mit den Deletionskassetten im Agarosegel aufgereinigt.

2.2.3 Hefe-Transformation mittels Elektroporation

Eine YPD-üN-Kultur einer Einzelkolonie wurde auf eine OD_{600} von 0,5 in frisches Medium verdünnt und bei 37 °C, 200 rpm inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600} von 1,2-2,0 erreicht hatte. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten, 4 °C) und das Pellet wurde in 8 ml H₂O bidest. suspendiert. Es wurden 1 ml 10 x TE-Puffer pH 7,5 und 1 ml 1M LiAc pH 7,5 zugegeben und 45 Minuten unter leichtem Schütteln (150 rpm, 30 °C) inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl 1 M DTT erfolgte eine weitere Inkubation von 15 Minuten (150 rpm, 30 °C). Das Röhrchen wurde mit H₂O bidest. auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten, 4 °C). Die Zellen wurden erst mit 25 ml kaltem H₂O bidest. und anschließend mit 1 ml sterilem, kaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 µl sterilem, kaltem 1 M Sorbitol suspendiert und als 40 µl Aliquots auf sterile Reaktionsgefäße auf Eis verteilt. 2 µl DNA (0,2 µg/µl) wurden mit den nun elektrokompenten Zellen vermischt und in die vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei einer Feldstärke von 0,9 kV/cm und einer Impulsdauer von 5-10 msec (GenePulser, Biorad, München, Germany). Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml sterilem, kaltem 1 M Sorbitol in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und auf entsprechende Selektions-Agarplatten ausplattiert. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30 °C konnten die Einzelkolonien geerntet werden.

2.2.4 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe wurde für die genetische Charakterisierung der Hefestämme benutzt. An die Isolierung der DNA schloss sich ein Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen und ein Southern Blot zur Visualisierung des Ergebnisses an.

Je Einzelkolonie wurde ein Kulturröhrchen mit 12 ml YPD-Medium + 100 µg/µl Uridin über Nacht (200 rpm, 30 °C) inkubiert. Die Kultur wurde geerntet (2000 rpm, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet mit 1 ml 1 M Sorbitol gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer suspendiert und 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (7000 rpm, 5 min, RT), in 800 µl Proteinase-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Zur Isolierung der

Nukleinsäuren wurden die Zellen mit 2-mal 0,8 ml und 1-mal 0,7 ml Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol vermischt, 1 min kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (14000 rpm, 3 min, RT). Jeweils die obere wässrige Phase wurde weiterverwendet und für den nächsten Schritt in ein frisches steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden aus 600 µl mit gleichem Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen (14000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 200 µl TE-RNaseA-Puffer gelöst und inkubiert (150 rpm, 30 min, 37 °C). Die DNA wurde mit 200 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol und anschließend 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die obere wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen Isopropanol gewendet und die gefällte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen (14000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde 10 min luftgetrocknet und in 100 µl H₂O bidest. gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (260 nm) bestimmt.

2.2.5 Restriktionsverdau

Die durch Phenol/Chloroform-Extraktion isolierte chromosomale DNA wurde vor dem Southern Blot geschnitten (s. Tabelle 7). Die im Blot detektierten Banden konnten dann bestimmten genetischen Zuständen zugeordnet werden.

20 µg der isolierten DNA wurden für einen Restriktionsverdau verwendet (1 Unit Restriktionsenzym, 1 x Puffer, evtl. 1 x BSA). Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 7: Restriktionsenzyme für den Verdau der chromosomalen DNA vor dem Southern Blot.

Deletionsmutante	Restriktionsenzyme
NYV 1	Cla I / Hind III
VAC 8	Nsi I / Sac II
VAM 3	Eco R I
VAM 7	Bgl II / Pst I
VPS 33	Bgl II / Hind III
VPS 41	Ssp I
VTC 1	Pst I / Stu I
VTC 3/2	Nsi I
VTC 4	Bgl II / Stu I
YPT 7	Cla I / Nsi I

Das Volumen wurde auf 120 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 12 µl NaAcetat mit 300 µl 100 % eiskaltem Ethanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen (14000 rpm, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 15 µl Ladepuffer gelöst (150 rpm, 30 min, 37 °C). Das gesamte Volumen wurde auf ein 0,6 % 1x TAE-Agarosegel aufgetragen.

2.2.6 Southern Blot

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurde im Southern Blot aufgetrennt und mittels Alkalischer Phosphatase und ECF-Substrat detektiert. Dazu wurde das 0,6 % Agarosegel kurz in H₂O bidest. geschwenkt und anschließend 30 min in 0,25 M HCl auf einer Wippe geschaukelt. Nach kurzem Waschen in H₂O bidest. wurde das Gel 30 min in 0,4 M NaOH auf der Wippe inkubiert. Der Southern Blot wurde wie folgt aufgebaut: Eine Schale wurde mit 0,4 M NaOH 1-2 cm hoch gefüllt. Eine Glasplatte wurde auf die Schale gelegt, auf sie wurde luftblasenfrei ein mit 0,4 M NaOH getränktes Filterpapier aufgewalzt, das mit beiden Enden in die NaOH-Lösung reichte. 6 Filterpapiere in der Größe des Gels wurden mit 0,4 M NaOH getränkt und luftblasenfrei aufgewalzt. Das Agarosegel wurde auf die Filterpapiere gelegt und mit einer zurechtgeschnittenen Nylonmembran bedeckt. Darauf wurden 6 trockene Filterpapiere gelegt und mit einem Stapel Papiertücher und einer Glasplatte beschwert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht. Die Filterpapiere und das Gel wurden verworfen, die Nylonmembran wurde vorsichtig abgenommen und kurz in 2 x SSC-Puffer geschwenkt. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurde die Membran leicht gerollt in ein Greiner-Röhrchen gesteckt und mit 2 ml Absättigungspuffer des AlkPhos Direkt™ Labeling Systems (Amersham, München, Germany) befeuchtet. Die Membran wurde unter leichtem Drehen 15-30 Minuten bei 55 °C vorinkubiert und anschließend 5-6 Stunden mit der Sonde hybridisiert, die gemäß Amersham Bioscience-Protokoll mit Alkalischer Phosphatase markiert wurde. Nach der Hybridisierung wurde die Membran gemäß Amersham Bioscience-Protokoll stringent bei 55 °C gewaschen und über Nacht mit ECF-Substrat bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert (25 µl/cm²). Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenz-Scanner (Storm 860 PhosphorImager, Molecular Dynamics, East Arques, CA, USA).

2.2.7 Färbung der Vakuolenmembran

Zur Visualisierung der Vakuolenmembran wurde der lipophile Fluoreszenzfarbstoff FM[□]4-64 [(N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide)] verwendet (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Dieser Styryl-Farbstoff

interkaliert nach exogener Zugabe schnell in die Plasmamembran, wird endozytiert und wandert durch vesikulären Transport zur Vakuole, in der er akkumuliert.

Eine YPD-üN-Kultur wurde auf die OD_{600} 0,1 verdünnt und nach Zugabe von 30 nM FM⁴-64 30 Minuten inkubiert (200 rpm, 30 °C). Die Zellen wurden geerntet (7000 rpm, 1 min) und mit 1 ml Farbstoff-freiem YPD-Medium gewaschen. Sie wurden in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und nochmals 45 Minuten inkubiert (200 rpm, 30 °C). Die Membranfärbung wurde unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Radiance 2000, Biorad, Hercules, CA, USA) bei 1000 x Vergrößerung betrachtet.

2.2.8 Induktion der Hyphenbildung

Beim sog. „Yeast-to-Hyphae-Übergang“, der zu den wichtigsten Virulenzfaktoren bei *Candida albicans* zählt, kann ein phänotypischer Wechsel zwischen kleinen runden Einzelzellen und filamentösem Wachstum beobachtet werden. Eine YPD-üN-Kultur wurde auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt und nochmals 1 Stunde inkubiert (200 rpm, 30 °C). Die Hyphenbildung wurde durch Zugabe von 10 % (v/v) FCS und Transfer zu 37 °C induziert und konnte unter dem Mikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Göttingen, Germany) beobachtet werden. Die Hyphenlänge wurde mittels eines Okulars mit Skala bestimmt.

2.2.9 Virulenzstudien *in vivo*

Um die Virulenz der hergestellten *Candida albicans* Stämme zu prüfen, wurde das Mausmodell für systemische Candidosis benutzt. Es wurden je 10 männliche Tiere (NMRI-Mäuse, Charles River) selben Alters und Gewichts pro Käfig gehalten und täglich versorgt. Die zu testenden *Candida*-Stämme wurden in YPD-Medium logarithmisch bei 30 °C (200 rpm) angezogen. Die Zellen wurden 3-mal mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen, und der Titer der Suspension wurde mittels Neuner-Zählkammer bestimmt. Zur Infektion wurden 200 µl mit jeweils 5×10^6 , 5×10^5 oder 5×10^4 Zellen verwendet und den immunkompetenten Mäusen intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert. Alle 24 Stunden wurde die Überlebensrate der Tiere über 30 Tage hinweg notiert.

2.3 Versuche mit Tumorzellen

2.3.1 Zelllinien und Wachstumsbedingungen

Für diese Arbeit wurden vier humane Karzinomzelllinien der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) verwendet: eine Brustkrebs-Zelllinie (MDA-MB-231), eine Lungenkrebs-Zelllinie (A549), eine pharyngeale Zelllinie der Kopf- und Nackenregion (HTB43) und eine Gebärmutterkrebs-Zelllinie (HTB35) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Charakterisierung der in dieser Studie verwendeten humanen Tumorzelllinien.

Name	ATCC-Nr.	Charakteristika
MDA-MB-231	HTB-26	Ursprungsorgan: Brust Wachstumseigenschaften: adhärent Morphologie: epithelial Cytogenetische Analyse: aneuploid, weiblich Zugeordnete Erkrankung: Adenokarzinom Bemerkung: Expression des Wnt7Bp-Onkogens, des EGF-Rezeptors und des KGF β -Rezeptors Biologische Sicherheitsstufe: 1
A549	CCL-185	Ursprungsorgan: Lunge Wachstumseigenschaften: adhärent Morphologie: epithelial Cytogenetische Analyse: hypotriploid, männlich Zugeordnete Erkrankung: Karzinom Bemerkung: P53p-Wildtyp, Keratin-Expression Biologische Sicherheitsstufe: 1
A549 mut. <i>P53</i>	CCL-185	A549 mit einem Plasmid, das mutiertes <i>P53</i> überexprimiert. Das Plasmid besitzt eine Ecdysone-nuclear-receptor-Untereinheit und ist Ponasterone A-induzierbar
HTB-43 (FaDu)	HTB-43	Ursprungsorgan: Pharynx Wachstumseigenschaften: adhärent Morphologie: epithelial Cytogenetische Analyse: hypodiploid bis hypertriploid, männlich Zugeordnete Erkrankung: Krebszellgeschwür der Kopf- und Nackenregion Biologische Sicherheitsstufe: 1
HTB-35 (SiHa)	HTB-35	Ursprungsorgan: Zervix Wachstumseigenschaften: adhärent

Morphologie: epithelial
 Cytogenetische Analyse: hypertriploid, weiblich
 Zugeordnete Erkrankung: Krebszellgeschwür
 Bemerkung: Tumorstadium II, Expression des P53p-Onkogens und pRBp-Onkogens
 Biologische Sicherheitsstufe: 2 (Zellen enthalten humanen Papovavirus HPV-16)

Die Tumorzellen wurden in Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO; Grand Island, NY, USA) mit Zusatz von 10 % fetalem Rinderserum (FCS, HyClone, Perbio Science, Bonn, Germany) und den Standardmengen an Penicillin (557 IU/ml)/Streptomycin (740 IU/ml) kultiviert. Für einige Versuche wurde die Zelllinie A549 mit einem Plasmid kultiviert, das mutiertes *P53* überexprimiert. Zur Transkriptionskontrolle arbeitet P53p als Tetramer, wenn nur eines dieser vier Moleküle ein mutiertes ist, kann keine Transkriptionsaktivierung mehr erfolgen. Der Plasmid besitzt eine Ecdysone-nuclear-receptor-Untereinheit und ist Ponasterone A-induzierbar. Bei Versuchen mit diesen Zellen wurde 24 h vor Versuchsbeginn einmalig 5 μ M Ponasterone A (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) zum Medium zugegeben, um die Plasmidexpression zu induzieren.

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer humiden wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 7 % CO₂ gehalten und routinemäßig subkultiviert, sobald Konfluenz erreicht wurde. Bei jeder Passage wurden die Zellen mit einer konstanten Dichte von 1×10^4 /cm² ausgesät. Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert, mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und die entsprechende Zellsuspension neu ausgesät. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Transfektion oder Bestrahlung wurde je nach Versuch mit subkonfluenten oder konfluenten Zellkulturen durchgeführt.

2.3.2 Transfektion mit siRNA

Die Zellen wurden 1 Tag vor der Transfektion in Medium ohne jegliche Antibiotikazusätze mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen in 12-well- oder 24-well-Zellkulturplatten (BD Falcon[®], San José, CA, USA) bzw. für Mikroskopie mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen in 6-well-Zellkulturplatten mit sterilen Deckgläsern ausgesät. Etwa eine Stunde vor der Transfektion wurde nochmals Medium gewechselt, um etwaige Trypsinreste zu entfernen. Die Transfektion wurde mit Lipofectamin[®] 2000 gemäß dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) durchgeführt. Die siGENOME SMARTpool Reagenzien (Tabelle 9) wurden

zur Transfektion mit Opti-MEM[®] I Reduced Serum (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) angesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für die restliche Versuchsdauer ebenfalls in Antibiotika-freiem Medium gehalten.

Tabelle 9: siGENOME SMARTpool-Reagenzien von Dharmacon (Lafayette, CO, USA).

Name	Kommentare, Sequenzen	Menge	Produkt-Nr.
5 x siRNA Puffer	100 mM KCl, 30 mM HEPES (pH 7,5), 1.0 mM MgCl ₂	1,5 ml	B-002000-UB-015
BECN1	Lokus ID 8678	5 nmol	M-010552-00-0005
APG3	Lokus ID 64422	5 nmol	M-015375-00-0005
APG4B	Lokus ID 23192	5 nmol	M-005786-00-0005
AUTL1 (APG4C)	Lokus ID 84938	5 nmol	M-005788-00-0005
APG5L	Lokus ID 9474	5 nmol	M-004374-00-0005
APG12L	Lokus ID 9140	5 nmol	M-010212-00-0005
siCONTROL non-targeting siRNA Pool	1) 5' AUGAACGUGAAUUGCUCAAUU 3' 2) 5' UAAGGCUAUGAAGAGAUACUU 3' 3) 5' AUGUAUUGGCCUGUAUUAGUU 3' 4) 5' UAGCGACUAAACACAUCAAUU 3'	5 nmol 20 nmol	D-001206-13-05 D-001206-13-20
siGLO RISC-free siRNA	Fluoreszenz-markierte, non-targeting siRNA, die bevorzugt in den RISC-Komplex aufgenommen wird; nützlicher Marker bei Co-Transfektion	5 nmol	D-001600-01-05

2.3.3 Bestrahlung

Die Zellen wurden bis zur Bestrahlung im Brutschrank gehalten und nach der Behandlung sofort wieder dorthin zurückgestellt. Bestrahlt wurde in einem Gulmay Medical RS225 Research System mit ionisierender Strahlung (200 kV, 15 mA, 3 Gy/min), das Feld hatte einen Durchmesser von 35 cm, die Distanz des Objekts zur Strahlenquelle betrug 53,7 cm. Das Bestrahlungsgerät war während der Bestrahlung auf 37 °C beheizt, die Behandlung fand unter aeroben Bedingungen statt.

2.3.4 RNA-Isolation

Die gesamte zelluläre RNA von $1-5 \times 10^5$ Zellen wurde mit dem Classic Line E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit (PeqLab, Erlangen, Germany) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurden photometrisch durch Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

2.3.5 OneStep RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit dem QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) gemäß Anleitung mit einem GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Der RT-PCR-Reaktionsmix enthielt je $0,5 \mu\text{M}$ forward- und reverse-Primer (Tabelle 10) (MWG, Ebersberg, Germany).

Tabelle 10: In dieser Studie verwendete Oligonukleotid-Primer.

Name	Sequenz
Beclin1_for	5'-AGC ATC GGG GGC TGA GGG ATG GAA GGG TCT AA-3'
Beclin1_rev	5'-CCC CCT AAG GAA AAA AGT CAT TTG TTA TAA A-3'
Apg3_for	5'-TAC TCC GGC CCC AGG ATG CAG AAT GTG ATT AA-3'
Apg3_rev	5'-GAT TTT ATG CTC TCT TCT TCA TTA CAT TGT GAA GTG T-3'
Apg4B_for	5'-GAT GTG GCA TCT AGA CTT TGG TTT ACA-3'
Apg4B_rev	5'-GGC CGA CCC CAG GAT TTT CAA AGG GAC AGG ATT TCA-3'
Apg4C_for	5'-GAT TTC ATT TCT AGA ATA TGG CTG ACC TA-3'
Apg4C_rev	5'-GGG ATC CAT TTT TCG AAA AGA CAT CTT TT-3'
Apg5_for	5'-TTA ACT CCT GGA AGA ATG ACA GAT GAC AAA G-3'
Apg5_rev	5'-TCA GGC AAA TAG TTG ATC CTT CAA TCT GTT GGC T-3'
Apg12_for	5'-TGT CTC CAA GCA AGA TGG CGG AGG AGC CGC AG-3'
Apg12_rev	5'-AGT TGA TTT TCT TTG TGG TTC ATC CCC ACG CCT G-3'
GAPDH_for	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
GAPDH_rev	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'

Gleichzeitig wurde eine RT-PCR-Reaktion mit *GAPDH*-Primern als internem Standard angesetzt. Die eingesetzte RNA-Menge, Zeit der Reversen Transkription, sowie Annealing-Temperatur und Zyklenanzahl sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden in einem 0,6 % 1x TBE-Agarosegel aufgetrennt.

Tabelle 11: Bedingungen für die RT-PCR mit dem QIAGEN One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Name	Eingesetzte RNA-Menge	RT-Reaktionszeit (min)	Annealing-Temperatur (°C)	Zyklusanzahl der PCR
<i>BECLIN1</i>	0,5 µg	60	45	40
<i>APG3</i>	0,5 µg	30	50	30
<i>APG4B</i>	0,5 µg	30	56	30
<i>APG4C</i>	0,2 µg	30	56	30
<i>APG5</i>	0,2 µg	30	56	30
<i>APG12</i>	0,2 µg	30	50	35
<i>GAPDH</i>	0,2-0,5 µg	30	63	30

2.3.6 LightCycler®-PCR

Für die quantitative LightCycler®-PCR wurde pro Probe 1,0 µg RNA mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) nach dem Protokoll des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in cDNA umgeschrieben: 1 µg RNA und 2 µl 0,8 µg/µl Oligo-p(dT)₁₅-Primer wurden mit sterilem Wasser auf 10,2 µl aufgefüllt und im GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) denaturiert (70 °C, 10 Min.). Anschließend wurde der Reaktionsmix (2 µl 10 Puffer, 4 µl MgCl₂, 2 µl dNTP-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor, 0,8 µl AMV-Reverse Transkriptase) zugegeben und die Umschreibung im GeneAmp[®] PCR System 2400 durchgeführt (25 °C, 10 Min.; 42 °C, 60 Min.; 99 °C, 5 Min.)

Von der cDNA wurde für die LightCycler®-PCR eine 1:5-Verdünnung angefertigt. Die LightCycler®-PCR wurde mit denselben Primern durchgeführt wie die OneStep RT-PCR, jedoch mussten hierzu die Annealing-Temperaturen neu optimiert werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Bedingungen für die LightCycler[®]-PCR mit dem LightCycler[®] Fast DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Name	Eingesetzte Menge	RNA- Annealing-Tempera- tur (°C)	Zyklusanzahl der PCR
<i>BECLIN1</i>	1,0 ng	60	50
<i>APG3</i>	1,0 ng	62	40
<i>APG4B</i>	1,0 ng	62	40
<i>APG4C</i>	1,0 ng	69	45
<i>APG5</i>	1,0 ng	69	45
<i>APG12</i>	1,0 ng	69	45
<i>GAPDH</i>	1,0 ng	62	40

LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ist ein gebrauchsfertiger Reaktionsmix für den LightCycler[®]. Es wird eine Hot-Start-PCR in 20 µl-Glaskapillaren durchgeführt. Die Amplifikation der PCR-Produkte kann über das Fluoreszenzsignal des SYBR Green I detektiert werden. SYBR Green I bindet an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix. In Lösung weist der ungebundene Farbstoff eine sehr schwache Fluoreszenz auf und verursacht kaum Hintergrundsignal, erst durch die DNA-Bindung wird die Fluoreszenz (530 nm) stimuliert. Somit ist während der PCR der Anstieg der SYBR Green I-Fluoreszenz direkt proportional zur gebildeten Menge an doppelsträngiger DNA. SYBR Green I ist auch über viele Amplifikationszyklen stabil. Die optischen Filter des LightCyclers[®] werden spezifisch an die Wellenlänge der Anregung und Emission angeglichen. LightCycler[®] erlaubt nicht nur Quantifizierung sondern auch Realtime-PCR. Als Kontrolle wurde pro Primer eine Wasser-Probe mitgeführt. Die Normalisierung der Daten basierte auf *GAPDH*, pro Primer wurde die relative RNA-Menge der Proben berechnet.

2.3.7 Protein-Isolation und Western Blot

Die Proteinlevel von Beclin1p und Apg5p wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Beclin1p (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) bzw. Apg5p (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; oder USBiological, Swampscott, MA, USA) und β -Aktin als interne Ladekontrolle (Sigma-Aldrich, München, Germany) ermittelt. Dazu wurden Gesamtzellextrakte präpariert: Tumorzellen wurden abtrypsiniert, 2-mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer für Proteinextraktion aufgenommen. Das Lysat wurde

dreimal kurz beschallt, 1 Stunde auf Eis auf der Wippe inkubiert und anschließend 15 min bei 8 °C abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch durch 3-fach Messung mit dem DC Protein Assay (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) bestimmt (Anthos HTII, Wals, Österreich). Mit 100-150 µg jeder Probe wurde eine Methanol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, um das Detergenz aus dem Lysepuffer zu eliminieren. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (Dalton Mark VII-L 14-70 kDa, Sigma-Aldrich, München, Germany) wurden mittels SDS-PAGE in einem 12,5 % oder 14 % Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) geblottet. Die Membran wurde mit Ponceau S (Sigma-Aldrich, München, Germany) gefärbt, um die Blottingeffizienz zu überprüfen und die Markerbanden einzuzeichnen. Nach 30 Minuten Absättigung mit 5 % Instant-Magermilchpulver (Frema Reform, Lüneburg, Germany) in 1x PBS pH 7,1 bei Raumtemperatur, wurde der Blot mit dem primären Antikörper inkubiert (polyklonaler (Maus-) Anti-Beclin1p-Antikörper 1:500 verdünnt über Nacht bei 8 °C; polyklonaler (Ziege-) Anti-Apg5p-Antikörper 1:100 verdünnt über Nacht bei 8 °C; polyklonaler (Kaninchen-) Anti- β -Aktin-Antikörper 1:200 verdünnt für 2 Stunden bei RT). Nach 3-mal 5 Minuten waschen mit PBS + 0,05 % Triton X-100 wurde der Blot 2 Stunden mit dem jeweiligen Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper (alle 1:2000 verdünnt) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (Ziege Anti-Maus-IgG (Pierce, Rockford, IL, USA), Kaninchen Anti-Ziege-IgG (Sigma-Aldrich, München, Germany) bzw. Ziege Anti-Kaninchen IgG (Pierce, Rockford, IL, USA)). Wiederum wurde der Blot 3-mal 5 Minuten gewaschen und die Proteinbanden mit dem ECL-Chemilumineszenz-Detektionssystem visualisiert (Super Signal West Femto, Pierce, Rockford, IL, USA). Nach der Detektion von Beclin1p bzw. Apg5p wurde der Blot zur densitometrischen Auswertung gegen β -Aktin als interne Ladekontrolle dekoriert, was den Vergleich der Proteinexpression zwischen verschiedenen Behandlungsbedingungen erlaubte. Nach dem letzten Waschen wurde der Blot zwischen Filterpapieren zur Aufbewahrung getrocknet. Zur Densitometrie der Banden wurde der Film mit Durchlicht eingescannt und mit Scion Image 1.63 analysiert. Die Bandenstärke der Ladekontrolle wurde immer in die Berechnung der Beclin1p-Banden miteinbezogen. Leider erkannte weder der Apg5p-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology noch der von USBiological die richtige Proteinbande, so dass dieses Protein nicht analysiert werden konnte.

2.3.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Elektronenmikroskopie ist derzeit die bestbewährte Methode zur Beobachtung der Autophagie. Autophagosomen sind Doppelmembranstrukturen, die unverdautes cytoplasmatisches Material enthalten. Die Membran-Cisternen der Autophagosomen sind meist kollabiert und stark osmiophil, was sie im Elektronenmikroskop leicht erkennbar macht. Oft ist die Unterscheidung zwischen Autophagosomen und Autolysosomen schwierig, so dass diese Strukturen einfach als „autophagische Vakuolen“ bezeichnet werden (Fengsrud *et al.*, 1995) (Mizushima, 2004).

Die Zellen wurden in 24-well-Platten mit 1×10^5 Zellen/well ausgesät und je nach Versuch 24 h später transfiziert. Weitere 2 Tage später wurden die Zellen mit 2,5 % Glutardialdehyd für 5 Minuten bei 37 °C fixiert, und anschließend in 2,5 % Glutardialdehyd in 200 mM PIPES pH 7,2 auf 4 °C äquilibriert. Die weiteren Fixierungsschritte einschließlich Einbettung wurden von Prof. Dr. Heinz Schwarz (Elektronenmikroskopisches Labor, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt. Dabei wurden die Glutardialdehyd-fixierten Proben in den 24-well-Platten mit 1 % Osmiumtetroxid in PBS 1 Stunde auf Eis postfixiert, mit H₂O bidest. gewaschen und 1 Stunde mit 1 % Uranylacetatlösung bei 4 °C behandelt. Anschließend wurden die Proben durch eine steigende Ethanolreihe dehydriert und in Epon-Kunstharz eingebettet. Jetzt wurden die Proben aus der 24-well-Platte ausgesägt und der Boden durch Temperaturwechsel zwischen flüssigem Stickstoff und heißem Wasser abgesprengt. Die nun freigelegte Unterseite wurde mit einer dünnen Eponschicht geschützt. Mit dem Mikrotom wurden die Eponblöcke zu einer Pyramide für Ultradünnschnitte getrimmt. Das Schneiden der Ultradünnschnitte und die Kontrastierung erfolgten durch Ursel Müller und Brigitte Sailer. Die Ultradünnschnitte wurden auf pioloformbefilmte Schlitzloch-Kupfernetzchen gelegt und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Proben wurden mit einem Philips CM10 Transmissionselektronenmikroskop bei 60 kV, 1 ms unter Vakuum angeschaut und photographiert.

2.3.9 Färbung autophagischer Vesikel mit GFP-LC3-Plasmid

Die Ubiquitin-artige post-translationale Modifikation des MAP1-LC3p (Microtubule-associated protein 1 light chain 3, oder kurz LC3) ist die erste bekannte Protein-Lipidation zwischen einem Protein und einem Phosphoglycerolipid: Gleich nach der Synthese wird die C-terminale Region durch die Apg4p-Protease nach einem konservierten Glycinrest gespalten, um die aktive Form LC3-IP zu produzieren. Die prozessierte Form (18 kDa) verbleibt frei im Cytosol. Nach Aktivierung durch das E1-Enzym Apg7p und Transfer auf das E2-Enzym Apg3p, wird es über eine Amidbrücke mit dem Ethanolamin-Teil des Phosphoglycerolipids

Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert und nun LC3-IIp genannt. LC3-IIp (16 kDa) assoziiert sowohl mit den inneren als auch mit den äußeren prä-autophagosomalen Membranen (Isolationsmembran), autophagosomalen Membranen und autophagischen Körpern. Obwohl LC3-IIp selbst keine membranübergreifende Region besitzt, verhält es sich wie ein integrales Membranprotein, da es durch die Konjugation mit PE genügend Hydrophobizität für eine Membraninsertion erlangt. In späten Stadien der Autophagie wird LC3-IIp der inneren Membran ins Lumen entlassen und abgebaut, während das LC3-IIp der äußeren Membran von der Protease Apg4p gespalten, zum cytosolischen LC3-Ip recycelt und ins Cytosol freigesetzt wird. Die reversible Lipidation ist für die Membrandynamik in der Autophagie notwendig. Die Menge an LC3-IIp korreliert mit der Autophagosomenanzahl bzw. dem Ausmaß der Autophagosomenbildung während Nährstoffmangels (Ichimura *et al.*, 2000) (Kabeya *et al.*, 2000) (Mizushima, 2004).

Die Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) mit dem LC3-Protein stellt ein nützliches Werkzeug zur morphologischen Analyse der Autophagie in Säugerzellen, -geweben und -organen dar. Unter normalen Bedingungen ist die GFP-LC3p-Fluoreszenz diffus über das gesamte Cytoplasma verteilt, unter Autophagie-induzierenden Bedingungen jedoch bildet die GFP-LC3p-Fluoreszenz punktartige Strukturen, die mit Autophagosomen oder Autolysosomen in vielen Geweben übereinstimmen (Qu *et al.*, 2003) (Shimizu *et al.*, 2004) (Meijer & Codogno, 2004) (Tanida *et al.*, 2004).

In dem verwendeten *GFP-LC3*-Plasmid wurde das LC3-Protein aus Ratten-cDNA per RT-PCR amplifiziert und in einen *GFP*-Expressionsvektor (pEGFP-C1; BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA, USA) inseriert. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Tamotsu Yoshimori, (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 50 000 Zellen/well in 6-well-Platten ausgesät, bei denen jedes well mit einem sterilen Deckglas bestückt worden war. 24 Stunden später wurden die Zellen in einem Schritt mit dem *GFP-LC3*-Plasmid (1 µg/ml) und je nach Fragestellung mit siRNA transfiziert. Die Effizienz dieser Doppeltransfektion wurde mittels einer Rot-fluoreszierenden Kontroll-siRNA (SiGLO RISC-Free siRNA) überprüft. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion bestrahlt und anschließend fixiert. Dazu wurde 4 % Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Germany) direkt zum Medium gegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und die Deckgläser mit der beschichteten Seite nach unten auf Objektträger mit MoWiol gelegt. Die Objekte

wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40 bzw. Axiovert 135, Zeis, Göttingen, Germany) bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 512 nm angeschaut und digital fotografiert. Für die Quantifikation der Vesikel wurden pro Behandlung 50 Zellen betrachtet und die autophagischen Vesikel/Zelle gezählt. Für statistische Zwecke wurde jeder Versuch 3-mal unabhängig wiederholt.

2.3.10 Positivkontrollen für Autophagie (Vinblastinsulfat und Rapamycin)

Vinblastinsulfat (VBL) depolymerisiert Mikrotubuli, die in die intrazelluläre Translokation von Autophagosomen, Endosomen und Lysosomen involviert sind. Diese Mikrotubuli-Inhibition blockiert die Fusion von Autophagosomen sowohl mit späten Endosomen als auch mit Lysosomen an einem Punkt nach der Autophagosomenbildung. Es kommt zur spezifischen Akkumulation von frühen autophagischen Vakuolen und zur Hemmung des Abbaus der Autophagosomen (Fengsrud *et al.*, 1995) (Rez *et al.*, 1999) (Munafò & Colombo, 2001).

Zur Autophagie-Induktion wurden die Zellen mit 1 mM Vinblastinsulfat für 0,5, 1, 2 oder 3 h behandelt und anschließend zur Mikroskopie fixiert.

Rapamycin ist ein antifungales, lipophiles Makrolid-Antibiotikum, das aus *Streptomyces hygroscopicus* von den Osterinseln /Rapa Nui isoliert wurde. Rapamycin hemmen die evolutionär konservierte TOR-Kinase durch Bildung eines Komplexes mit dem Rapamycin-Rezeptor FKBP12p (FK506-binding protein, molecular mass of 12 kDa) (Raught *et al.*, 2001) (Webb *et al.*, 2003) (Takeuchi *et al.*, 2005) (Kondo *et al.*, 2005). TOR-Komplex1 kontrolliert Zellwachstum und Proteinsynthese über den Rapamycin-sensitiven Signalweg mit dem Protein Raptor (regulatory-associated protein of mTOR). Bei ausreichender Nährstoffzufuhr wird die Translation, die Ribosomen-Biogenese, die Aktivität hochaffiner Aminosäurepermeasen und die Transkription vieler Enzyme, die in verschiedene metabolische Signalwege involviert sind, gesteigert. Katabolische Prozesse wie RNA-Abbau, Autophagie und andere Degradationswege werden negativ reguliert. Über diese mTOR-Raptor-Aktivierung erhalten Tumoren einen Wachstumsvorteil, daher wirkt Rapamycin als effektives Cytostatikum in Tumoren mit hyperaktivem *AKT*-Signal (Guertin & Sabatini, 2005) (Hay, 2005) (Wullschleger *et al.*, 2005). TOR-Komplex2 kontrolliert den Rapamycin-unempfindlichen Signalweg mit dem Protein Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR). Dieser Komplex reguliert und reorganisiert das Aktin-Cytoskelett. Es scheint ein Gleichgewicht zwischen den beiden TOR-Komplexen in der Zelle zu geben: Die Bildung des mTOR-Raptor-Komplexes antagonisiert die Bildung des mTOR-Rictor-Komplexes. Beim Fehlen eines *TOR*-Signals, werden mRNA-Translation und die Ribosomen-Biosynthese blockiert und Autophagie wird aktiviert

(Klionsky & Emr, 2000) (Raught *et al.*, 2001) (Suzuki *et al.*, 2001) (Shintani *et al.*, 2001) (Levine & Klionsky, 2004) (Feng *et al.*, 2005) (Hay, 2005) (Wullschleger *et al.*, 2005) (Guertin & Sabatini, 2005).

Zur Autophagie-Induktion wurden die Zellen mit 22 μ M Rapamycin für 48 oder 72 h behandelt und anschließend zur Mikroskopie fixiert.

2.3.11 Koloniebildungstest: Überlebenstest für Tumorzellen nach Bestrahlung

In diesem Test wird die zelluläre Sensitivität über das klonogene Überleben bestimmt. Die Methode erlaubt den Vergleich des Radiosensitivitätsprofils von Zellen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung und (Vor)behandlung. Für den Koloniebildungstest nach Einzeldosisbestrahlung wurden die Zellen zuerst in 24-well-Platten ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in den 24-well-Platten mit Einzeldosen von 0-4 Gy bestrahlt und sofort danach abtrypsiniert, gezählt, 1:10 bzw. 1:100 verdünnt und mit Dichten von 250-800 Zellen/well je nach Bestrahlungsdosis in 6-well-Platten in 2 ml DMEM-Kulturmedium eingesät. Anschließend wurden die Zellen 10 Tage im Brutschrank bei 37 °C ohne weiteren Mediumwechsel inkubiert.

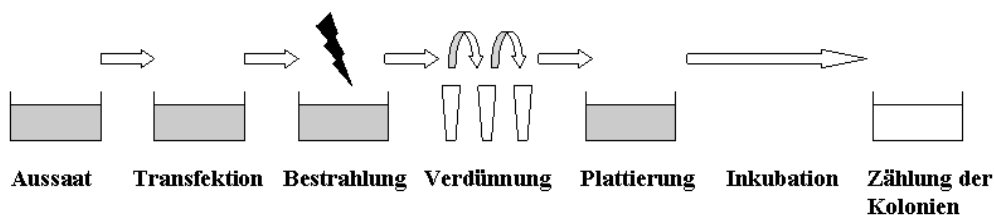


Abbildung 5: Schematischer Abfolge des Koloniebildungstests.

Für den Koloniebildungstest nach fraktionierter Bestrahlung wurden die Zellen in 12-well-Platten ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurde die erste Bestrahlungsdosis (1 Gy) verabreicht. Alle 24 Stunden folgte eine weitere Dosis (je 1 Gy). Sofort nach der jeweils letzten Bestrahlungsdosis wurden die Zellen abtrypsiniert und nach Auszählung mit Dichten von 200-800 Zellen/well je nach Bestrahlungsgesamtdosis in 6-well-Platten in 2 ml DMEM-Kulturmedium eingesät. Anschließend wurden die Zellen 10 Tage bei 37 °C ohne weiteren Mediumwechsel im Brutschrank inkubiert. Für die statistische Analyse wurde dieser Versuch in einer verkürzten Variante 3x wiederholt. Dabei wurde ein Vergleich der unbestrahlten Kontrolle mit der Bestrahlungsdosis 4 Gy durchgeführt.

Zur Bestimmung der Koloniebildung aus Einzelzellen wurde der Test nach der Inkubationszeit abgestoppt, fixiert, gefärbt und ausgewertet. Dazu wurden die Kulturen mit PBS gewaschen, je 10 Minuten mit 3,7 % Paraformaldehyd und 70 % Ethanol fixiert, mit dest. H₂O bidest. gewaschen und mit 0,05 % Coomassie-Lösung gefärbt. Die Platten wurden unter dem Binokular (Stemi 2000, Zeiss, Göttingen, Germany) analysiert, dazu wurde die Anzahl gebildeter Kolonien bestimmt. Eine Kolonie ist eine Population von Zellen, die aus einer Einzelzelle durch mitotische Teilung entstanden ist. Für die Berechnung der Überlebensfraktion werden per Definition nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen gewertet. Die Anwachsrate (Planting efficiency; PE) wurde mit der Formel

$$PE (\%) = \frac{100 \times \text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}}$$

bestimmt. Um eine Behandlung zu quantifizieren,

wurde die Überlebensrate (Survival Fraction; SF) mit $SF = \frac{PE \text{ der Bedingung}}{PE \text{ der Kontrolle}}$ ermittelt.

Die Anwachsrate von siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen wurde als 100 % bzw. deren Überlebensrate als 1,0 gesetzt. Der direkte Vergleich der Daten wurde bei Dosis-Wirkungskurven mit Einzeldosisbestrahlung im linear-quadratischen Modell und bei Dosis-Wirkungskurven mit fraktionierter Bestrahlung mittels linearer Regression (SigmaPlot 2001) abgebildet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse: Vakuolenfunktion bei *Candida albicans*

3.1.1 Identifikation der zehn vakuolären Kandidatengene im *Candida albicans*-Genom

Ausgangspunkt für den Virulenzscreen waren zehn Gene mit bekannter Funktion in der Vakuolenmembranfusion bei *Saccharomyces cerevisiae*. In einem BLAST-Abgleich in Incyte Proteome BioKnowledge² Library YPD² wurde nach den Homologen zu diesen Genen im *Candida albicans*-Genom gesucht. Die Open reading frames mit der besten Sequenzübereinstimmung wurden als Kandidatengene für die vorliegende Arbeit verwendet. Tabelle 13 zeigt die Namen der betreffenden zehn Gene in *Saccharomyces cerevisiae*, die im Folgenden ebenfalls für die Kandidatengene bei *Candida albicans* beibehalten wurden, sowie ihre Open reading frames in *Saccharomyces cerevisiae*, die Open reading frames in *Candida albicans* und

die prozentuale Homologie zwischen beiden Hefearten. Da zu den Genen *VTC3* und *VTC2* von *S. cerevisiae* nur ein Open reading frame in *C. albicans* mit ähnlicher Homologie zu beiden Genen gefunden wurde, wurde im Folgenden die Bezeichnung *VTC3/2* verwendet.

Tabelle 13: Name der zehn vakuolären Kandidatengene, Open reading frames bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* und Homologie zu *Saccharomyces cerevisiae*, entnommen aus Incyte Proteome BioKnowledge[®] Library YPD[®].

Genname	Open reading frame in <i>S. cerevisiae</i>	Open reading frame in <i>C.</i> <i>albicans</i>	% Homologie zu <i>S. cerevisiae</i>
<i>NYV1</i>	YLR093C	6.7466	28
<i>VAC8</i>	YEL013W	6.4134	69
<i>VAM3</i>	YOR106W	6.9162	26
<i>VAM7</i>	YGL212W	6.1748	27
<i>VPS33</i>	YLR396C	6.3905	24
<i>VPS41</i>	YDR080W	6.7353	39
<i>VTC1</i>	YER072W	6.8691	83
<i>VTC3/2</i>	YPL019C (<i>vtc3</i>)	6.6326	41 % zu <i>vtc3</i> ,
	YFL004W (<i>vtc2</i>)		43 % zu <i>vtc2</i>
<i>VTC4</i>	YJL012C	6.1784	61
<i>YPT7</i>	YML001W	6.5901	63

3.1.2 Herstellung der Deletionsmutanten am Beispiel von *CaVAM3*

Es wurden heterozygote und homozygote Nullmutanten durch sequenzielle sequenzspezifische Rekombination hergestellt.

Zuerst wurden zu allen zehn vakuolären Kandidatengeneten heterozygote Deletionsmutanten konstruiert, am Beispiel von *CaVAM3* soll das Vorgehen erläutert werden. Das hierzu verwendete Plasmid pSFU1 enthält die *URA3*-Flipper-Kassette, die durch multiple Klonierungsstellen flankiert wird. Die Deletionskassetten für *CaVAM3* wurden laut Material und Methoden 2.2.2 hergestellt. Für die heterozygote *CaVAM3*-Deletionsmutante wurde zunächst das Kpn I/Sac I-Fragment des Plasmids pVAM3ko in den *URA3*-negativen *Candida albicans*-Stamm CAI4 transformiert und auf Uridin-negativen HC-Agarplatten selektiert. Die Transformanten wurden mittels Southern Blot nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit Eco R I überprüft (s. Material und Methoden 2.2.3 bis 2.2.6.). Das PCR-Produkt des 5'-UTR wurde mit Alkalischer Phosphatase markiert und diente als Sonde für den Southern Blots.

Während das *CaVAM3*-Wildtypgen im Southern Blot mit einer Bande von 2,3 kb hybridisiert, resultierte die Substitution eines Allels durch die *URA3*-Flipper-Kassette in einem zusätzlichen Fragment der Länge 3,0 kb im transformierten Stamm CAVAM3S (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Um den *URA3*-Selektionsmarker auch für die Deletion des zweiten *CaVAM3*-Allels verwenden zu können, musste die *URA3*-Flipper-Kassette aus dem heterozygoten Knock-out entfernt werden. Eine Einzelkolonie von CAVAM3S wurde in YCB-BSA-Medium (+ 100 µg/ml Uridin) inkubiert (200 rpm, 30 °C, üN). Die Induktion in Medium mit geringem Stickstoffgehalt aktiviert den *SAP2*-Promoter, und nachfolgend die Expression der *FLP*-Rekombinase zur Entfernung der *URA3*-Flipper-Kassette. Zurück bleibt eine einzelne *FRT*-Sequenz. Die YCB-BSA-Kultur wurde zur Selektion auf Minimal-HC-Agarplatten (10 µg/ml) plattiert, auf denen die *URA*-auxotrophen Klone zu kleinen Kolonien wuchsen. Deren *URA*-Auxotrophie wurde auf *URA*-negativen Replikplatten, auf denen die Klone ohne *URA3*-Flipper-Kassette nicht mehr wachsen konnten, und durch Southern Blot bestätigt. Durch die Entfernung der *URA3*-Flipper-Kassette verschwand das 3,0 kb-Fragment und stattdessen hybridisierte eine Bande von 1,5 kb im Stamm CAVAM3R (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Anschließend wurde das zweite Wildtypallel von *CaVAM3* durch einen stabil integrierten *URA3*-Marker ersetzt. Diese homozygote Deletionsmutante sollte erste Virulenzversuche der Stämme im Mausmodell für systemische Candidosis erlauben. Zur Herstellung dieser Mutante wurde das verbliebene *CaVAM3*-Allel durch das Kpn I/Sac I-Fragment des Plasmids pVAM3koURA durch Rekombination ersetzt. Im Southern Blot ergab sich dadurch statt der 2,3 kb großen Wildtyp-Bande ein 1,7 kb-Fragment (s. Abbildung 6 und Abbildung 7). Der resultierende Stamm CAVAM3D ist eine Nullmutante, bei der das eine *CaVAM3*-Allel durch eine *FRT*-Seite und das andere durch das *URA3*-Markergen ersetzt wurde.

In der Zwischenzeit wurde eine weitere homozygote Deletionsmutante hergestellt, in der das zweite Wildtypallel von *CaVAM3* durch die *URA3*-Flipper-Kassette ersetzt wurde. Diese Mutante ließ sich dann auch wieder für eine Revertierung verwenden. Hierfür musste der Stamm CAVAM3R wiederum mit dem Kpn I/Sac I-Fragment des Plasmids pVAM3ko transformiert werden. Bei der gewünschten Integration der *URA3*-Flipper-Kassette wurde das zweite Wildtypallel durch die Kassette ersetzt. Der entstandene Stamm CAVAM3F (s. Abbildung 6 und Abbildung 7) hybridisierte im Southern Blot mit einer Bande von 1,5 kb (*FRT*-Seite) und einer Bande von 3,0 kb (*URA3*-Flipper-Kassette).

Wiederum musste der *URA3*-Selektionsmarker entfernt werden, um ihn für die Herstellung der Revertierungsmutante zur Verfügung zu haben. Eine Einzelkolonie von CAVAM3F wurde in YCB-BSA-Medium (+ 100 µg/ml Uridin) zur Exzision der *URA3*-Flipper-Kassette induziert. Der resultierende Stamm CAVAM3H stellte eine homozygote Deletionsmutante dar, bei der beide *CaVAM3*-Wildtypallele jeweils durch eine *FRT*-Seite ersetzt wurden. Im Southern Blot zeigte sich eine einzige Bande von 1,5 kb für beide Fragmente (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Für die Infektionsexperimente sollte der Knock-out-Effekt der Deletionsmutanten wieder revertiert werden. Dazu wurde der Stamm CAVAM3H mit dem Kpn I/Sac I-Fragment des Plasmids pVAM3rev transformiert. Durch diesen Rekombinationsschritt wurde eine der beiden *FRT*-Seiten durch ein *CaVAM3*-Wildtypgen zusammen mit einem *URA3*-Markergen ersetzt. Der Stamm CAVAM3Re zeigt im Southern Blot ein Fragment der Länge 1,5 kb, welches die *FRT*-Seite repräsentiert, und eines der Länge 2,9 kb, das die Sequenz aus *CaVAM3*-Wildtypgen und *URA3*-Markergen widerspiegelt (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

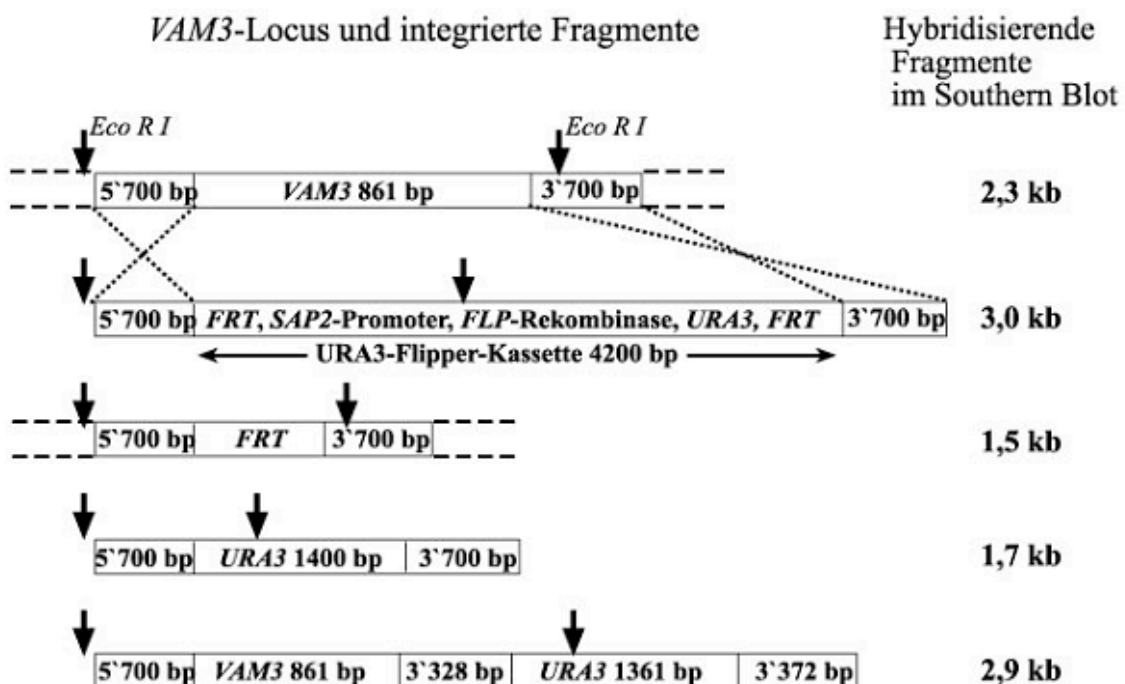


Abbildung 6: Schematischer Überblick über die Knock-out-Konstrukte.

(1. Zeile) Das *CaVAM3*-Wildtypallel mit den 5'- und 3'-UTRs. Die *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen für den Verdau der genomischen DNA sind mit Pfeilen markiert. Die Länge der im Southern Blot resultierenden Fragmente ist angegeben. (2. Zeile) Durch intrachro-

mosomale Rekombination wurde ein Wildtypallel durch die *URA3*-Flipper-Kassette ersetzt. (3. Zeile) Induktion des *SAP2*-Promoters veranlasste die *FLP*-Rekombinase, die *URA3*-Flipper-Kassette bis auf eine *FRT*-Seite auszuschneiden. (4. Zeile) Das zweite *CaVAM3*-Wildtypallel wurde durch ein stabiles *URA3*-Markergen ersetzt. (5. Zeile) Um den Knock-out-Effekt zu revertieren, wurden eine Kopie des *CaVAM3*-Wildtypgens und des *URA3*-Markergens in die homozygote Deletionsmutante eingeführt.

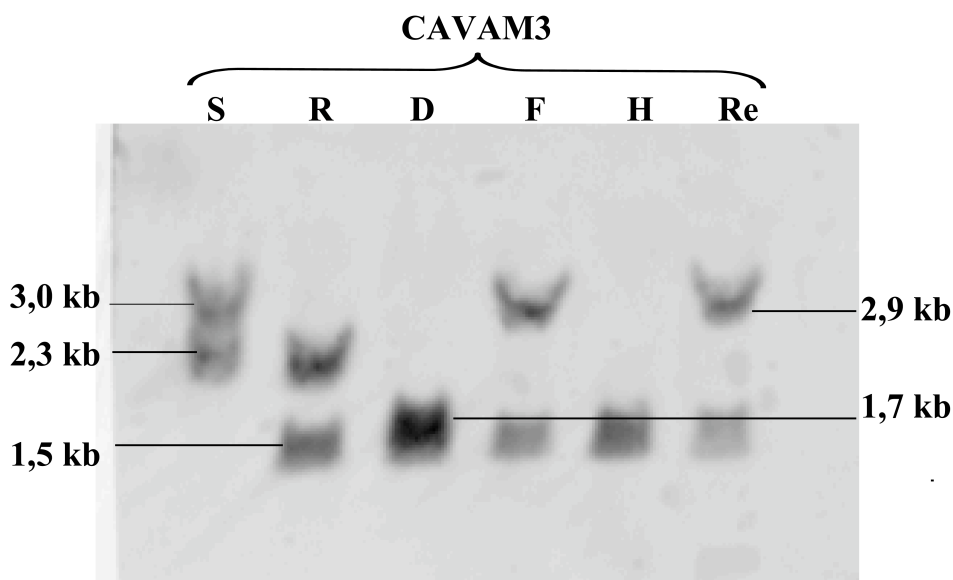


Abbildung 7: Southern Blot der *CaVAM3*-Deletionsmutanten.

Die Größen der hybridisierenden Fragmente sind angegeben. *VAM3*-Wildtyp-DNA hybridisiert als Fragment der Größe 2,3 kb; die Integration der *URA3*-Flipper-Kassette resultiert in einem Fragment von 3,0 kb; die *FRT*-Seite führt zu einem Fragment von 1,5 kb; die Integration des *URA3*-Markergens resultiert in einer Fragmentgröße von 1,7 kb; das Konstrukt aus *VAM3* + *URA3* hybridisiert als Fragment von 2,9 kb. EcoRI-geschnittene chromosomale DNA des Stammes CAVAM3S (*vam3::vam3/vam3::URA3-FLIP*) (1. Spalte), CAVAM3R (*vam3::vam3/vam3::FRT*) (2. Spalte), CAVAM3D (*vam3::FRT/vam3::URA3*) (3. Spalte), CAVAM3F (*vam3::FRT/vam3::URA3-FLIP*) (4. Spalte), CAVAM3H (*vam3::FRT/vam3::FRT*) (5. Spalte), CAVAM3Re (*vam3::FRT/vam3::vam3+URA3*) (6. Spalte).

Ebenso wurde bei den anderen neun vakuolären Kandidatengen verfahren. Zunächst wurde in allen Hefestämmen das erste Wildtypallel durch die *URA3*-Flipper-Kassette ersetzt (CANYV1S, CAVAC8S, CAVAM7S, CAVPS33S, CAVPS41S, CAVTC1S, CAVTC3/2S, CAVTC4S und CAYPT7S). Durch Exzision der *URA3*-Flipper-Kassette wurden alle neun heterozygoten Deletionsmutanten generiert, bei denen ein Wildtypallel durch die *FRT*-Seite ersetzt wurde (CANYV1R, CAVAC8R, CAVAM7R, CAVPS33R, CAVPS41R, CAVTC1R, CAVTC3/2R, CAVTC4R und CAYPT7R). Anschließend wurden die homozygoten Deleti-

onsmutanten hergestellt, bei denen das zweite Wildtypallel durch das stabil integrierte *URA3*-Markergen substituiert wurde (CANYV1D, CAVAC8D, CAVAM7D, CAVPS33D, CAVPS41D, CAVTC1D, CAVTC3/2D, CAVTC4D und CAYPT7D), und die Deletionsmutanten, die zwei *FRT*-Seiten anstelle der Wildtypallele tragen (CANYV1H, CAVAC8H, CAVAM7H, CAVTC1H, CAVTC3/2H und CAVTC4H). Leider konnten trotz zahlreicher Transformationsversuche nicht zu allen Stämmen beide homozygoten Deletionsmutanten hergestellt werden. Die Nullmutante, in denen beide Wildtypallele jeweils durch eine *FRT*-Sequenz ersetzt werden sollten, schien für die Gene *CaVPS33*, *CaVPS41* und *CaYPT7* letal zu sein.

Die Stämme wurden im Mausmodell für systemische Candidosis auf ihre Virulenz *in vivo* überprüft. Nur für die zwei Gene, bei denen ein Knock-out-Effekt zu beobachten war, wurden die Revertierungsmutanten konstruiert, die eine *FRT*-Seite und das Wildtypgen zusammen mit dem *URA3*-Markergen besitzen (CAVAM3Re und CAYPT7Re). Tabelle 14 zeigt schematisch die hybridisierenden Fragmente und deren Größen im Southern Blot für alle zehn Kandidatengene.

Tabelle 14: Die Knock-out-Konstrukte der zehn Kandidatengene, die zur Transformation verwendeten Plasmide und die Fragmentgrößen im Southern Blot nach Schnitt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und Hybridisierung mit den angegebenen PCR-Produkten als Sonde.

***CaNYVI*: Cla I/Hind III; 5'-UTR als Sonde**

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>NYVI</i> (819 bp) – 3'(700 bp)	1707 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	2843 bp	pNYV1ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	2272 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	3612 bp	pNYV1koURA

CaVAC8: Nsi I/Sac II; 5'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VAC8</i> (1758 bp) – 3'(500 bp)	3789 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(500 bp)	2073 bp	pVAC8ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(500 bp)	1565 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(500 bp)	2905 bp	pVAC8koURA

CaVAM3: Eco R I; 5'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VAM3</i> (861 bp) – 3'(700 bp)	2317 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	3027 bp	pVAM3ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	1496 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	1683 bp	pVAM3koURA
5'(700 bp) – <i>VAM3</i> (861 bp) – 3'(328 bp) – <i>URA3</i> (1361 bp) – 3'(372 bp)	2873 bp	pVAM3rev

CaVAM7: Bgl II/Pst I; 3'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VAM7</i> (894 bp) – 3'(700 bp)	4545 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	1280 bp	pVAM7ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	3651 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	1280 bp	pVAM7koURA

CaVPS33: Bgl II/Hind III; 5'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VPS33</i> (2097 bp) – 3'(700 bp)	1066 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	2976 bp	pVPS33ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	1500 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	3840 bp	pVPS33koURA

CaVPS41: Ssp I; 5'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VPS41</i> (2498 bp) – 3'(700 bp)	1504 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	1129 bp	pVPS41ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	2292 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	1962 bp	pVPS41koURA

CaVTC1: Pst I/Stu I; 3'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VTC1</i> (348 bp) – 3'(700 bp)	1788 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	1079 bp	pVTC1ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	1480 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	1079 bp	pVTC1koURA

CaVTC3/2: Nsi I; 5'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – <i>VTC3/2</i> (2355 bp) – 3'(700 bp)	4608 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> -Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	1306 bp	pVTC3/2ko
5'(700 bp) – <i>FRT</i> – 3'(700 bp)	2293 bp	
5'(700 bp) – <i>URA3</i> (1400 bp) – 3'(700 bp)	3633 bp	pVTC3/2koURA

CaVTC4: Bgl II/Stu I; 5'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(700 bp) – VTC4 (2130 bp) – 3'(700 bp)	3380 bp	
5'(700 bp) – URA3-Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	5504 bp	pVTC4ko
5'(700 bp) – FRT – 3'(700 bp)	1290 bp	
5'(700 bp) – URA3 (1400 bp) – 3'(700 bp)	2692 bp	pVTC4koURA

CaYPT7: Cla I/Nsi I; 3'-UTR als Sonde

Konstrukt	Fragmentgröße	Plasmid
5'(500 bp) – YPT7 (654 bp) – 3'(700 bp)	1460 bp	
5'(500 bp) – URA3-Flipper-Kassette (4200 bp) – 3'(700 bp)	3391 bp	pYPT7ko
5'(500 bp) – FRT – 3'(700 bp)	1835 bp	
5'(500 bp) – URA3 (1400 bp) – 3'(700 bp)	3175 bp	pYPT7koURA
5'(500 bp) – YPT7 (654 bp) – 3'(51 bp) – URA3 (1361 bp) – 3'(649 bp)	2820 bp	pYPT7rev

3.1.3 Vakuoläre Morphologie der *Candida albicans*-Nullmutanten

Die Deletion der zehn für diese Arbeit ausgewählten Gene resultiert in einem unterschiedlichen Fragmentierungsgrad der Vakuolen in *Saccharomyces cerevisiae* (Wada *et al.*, 1992) (Wada & Anraku, 1992). Die vakuoläre Morphologie der heterozygoten und homozygoten *Candida*-Deletionsmutanten wurde durch Färbung der Vakuolenmembran mit FM[®]4-64 (s. Material und Methoden 2.2.7) überprüft. Alle heterozygoten Mutanten hatten einen Wildtyp-Phänotyp bezüglich der Vakuolenmorphologie. Die vakuolären Phänotypen der homozygoten Mutanten CANYV1D und CAVPS41D zeigten geringfügig vergrößerte Vakuolen im Vergleich zum Wildtyp. Bei den homozygoten Deletionsmutanten jedoch zeigte der Stamm CAVAM3D eine geringe Vakuolenfragmentierung, während der Stamm CAYPT7 eine sehr starke Fragmentierung des vakuolären Kompartiments aufwies (s. Abbildung 8). Diese Phänotypen sind mit denen der entsprechenden Deletionsmutanten in *Saccharomyces cerevisiae* vergleichbar. Damit konnte bestätigt werden, dass in *Candida albicans* tatsächlich die orthologen Gene zu *Saccharomyces cerevisiae* deletiert wurden.

Die Wachstumsrate der heterozygoten Deletionsmutanten in YPD-Medium mit Zusatz von 100 µg/ml Uridin war wie beim Wildtyp CAI4. Die Wachstumsgeschwindigkeit der homozygoten Mutanten von *CaVAM3* und *CaYPT7* war leicht verzögert, so hatte z. B. CAVAM3D eine um 10 % und CAYPT7D um 5 % verlängerte Generationszeit im Vergleich zum Wildtypstamm CAI4.

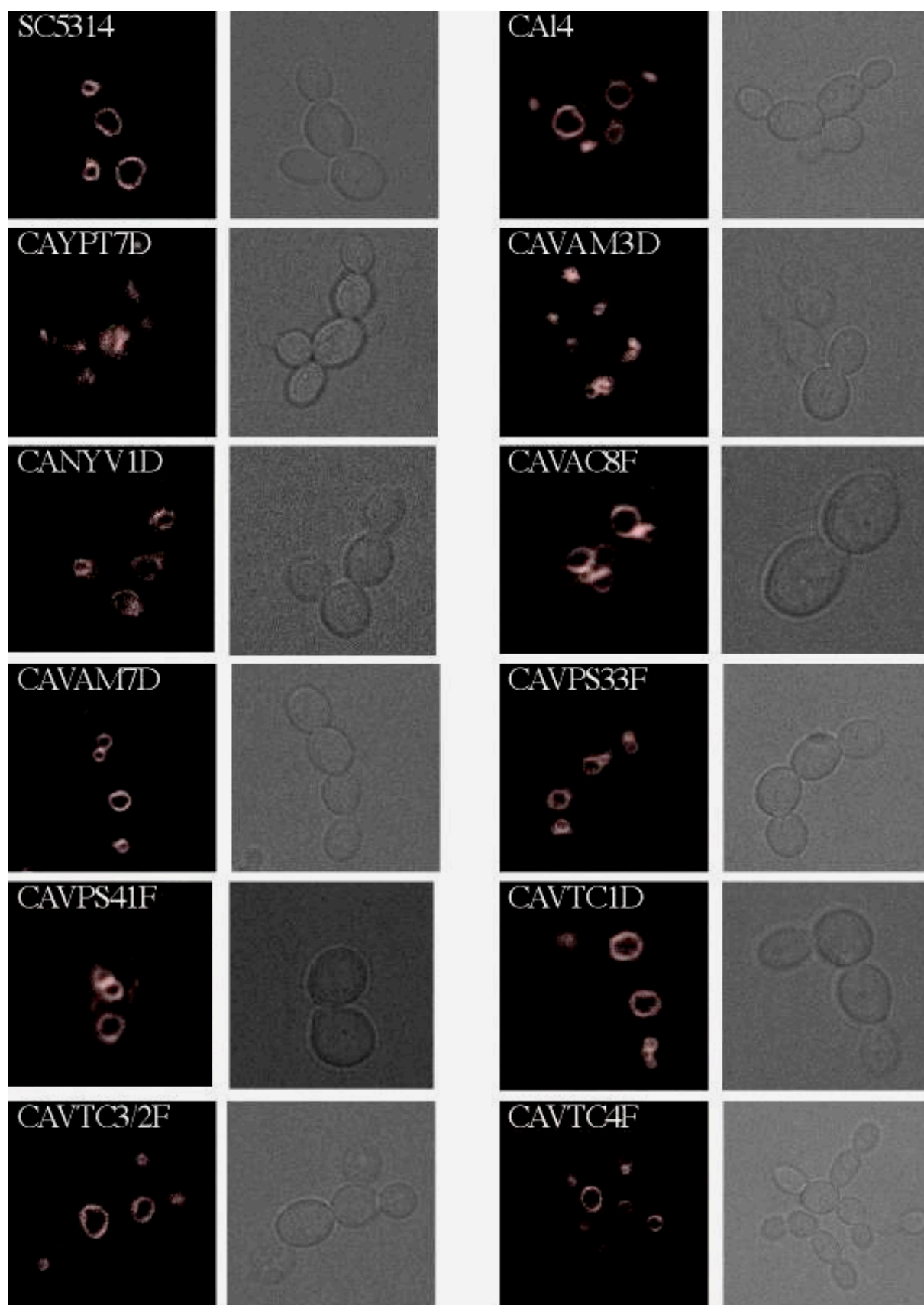


Abbildung 8: Vakuolenmorphologie von Wildtyp und Deletionsmutanten nach Färbung mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff FM[®] 4-64.

Linke Spalte: Fluoreszenzmikroskopie, rechte Spalte: Nomarsky-Optik. A) SC5314 (Wildtyp), B) CAI4 (Wildtyp), C) CAYPT7D (*ypt7::FRT/ypt7::URA3*), D) CAVAM3D (*vam3::FRT/vam3::URA3*), E) CANYV1D (*nyv1::FRT/nyv1::URA3*), F) CAVAC8F (*vac8::FRT/vac8::URA3-FLIP*), G) CAVAM7D (*vam7::FRT/vam7::URA3*), H) CAVPS33F (*vps33::FRT/vps33::URA3-FLIP*), I) CAVPS41F (*vps41::FRT/vps41::URA3-FLIP*), J) CAVTC1D (*vtc1::FRT/vtc1::URA3*), K) CAVTC3/2F (*vtc3/2::FRT/vtc3/2::URA3-FLIP*), L) CAVTC4F (*vtc4::FRT/vtc4::URA3-FLIP*).

3.1.4 Virulenz der heterozygoten und homozygoten *Candida*-Mutanten *in vivo*

Um die Beziehung zwischen Vakuolenfragmentation und Virulenz zu testen, wurden die in dieser Arbeit hergestellten Stämme und die Wildtypstämme im Mausmodell für systemische Candidosis getestet (s. Material und Methoden 2.2.9). In einem Vorversuch wurden die zehn Deletionsmutanten CANYV1D, CAVAC8D, CAVAM3D, CAVAM7D, CAVPS33D, CAVPS41D, CAVTC1D, CAVTC3/2D, CAVTC4D, CAYPT7D und der Wildtypstamm SC5314 mit jeweils drei verschiedenen Zellkonzentrationen (5×10^6 , 5×10^5 und 5×10^4 Zellen) an je 10 Tieren getestet. Abbildung 9 zeigt die Infektionsergebnisse einiger *Candida*-Stämme.

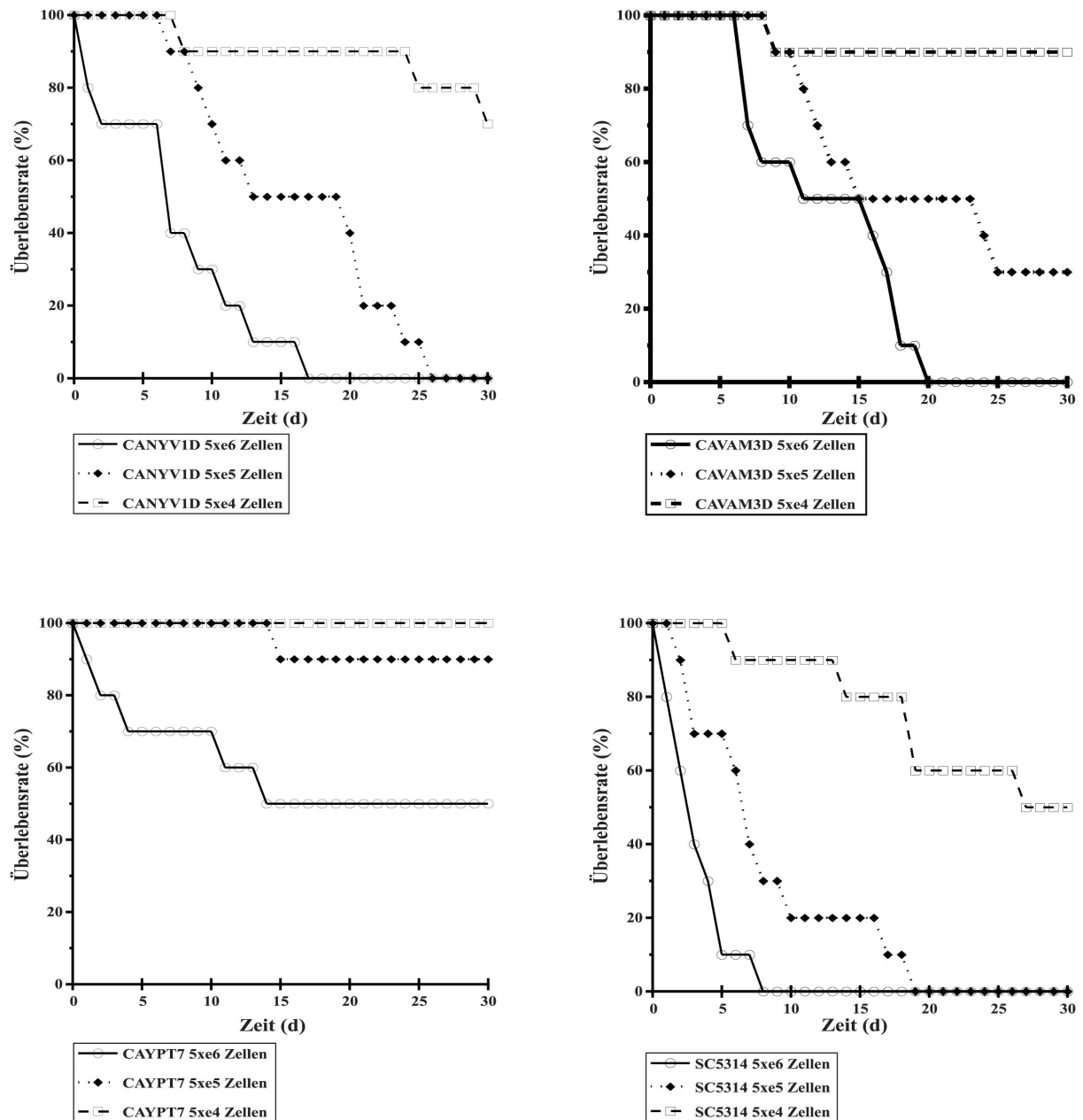


Abbildung 9: Virulenz von drei Deletionsmutanten (CANYV1D, CAVAM3D und CAYPT7D) im Vergleich zum Wildtyp SC5314 über 30 Tage mit je drei verschiedenen Injektionsdosen (n = 10).

Die Deletionsmutanten CANYV1D, CAVAC8D, CAVAM7D, CAVPS33D, CAVPS41D, CAVTC1D, CAVTC3/2D und CAVTC4D wichen nur wenig von der Virulenz des Wildtyps SC5314 ab. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Virulenz des Stammes CANYV1D. Während die Deletionsmutante CAVAM3D nur eine schwach verminderte Virulenz verglichen zum Wildtyp zeigte, war die des Stammes CAYPT7D signifikant reduziert. Beim Wildtyp SC5314 betrug die Überlebensrate bei 5×10^6 und 5×10^5 Zellen 0 % über 30 Tage, bei CAYPT7D wa-

ren es 50 % bzw. 90 %. Beim Wildtyp SC5314 war die Überlebensrate mit der injizierten Dosis von 5×10^4 Zellen über 30 Tage gesehen zu 50 % tödlich, bei CAYPT7D betrug die Überlebensrate 100 %.

Allerdings hatte das *URA3*-Markergen einen Einfluss auf die Virulenz der *Candida*-Stämme (Lay *et al.*, 1998) (Gow *et al.*, 2002). Sichtbar wurde das beim Vergleich der Wildtypstämme SC5314 und CAI4.

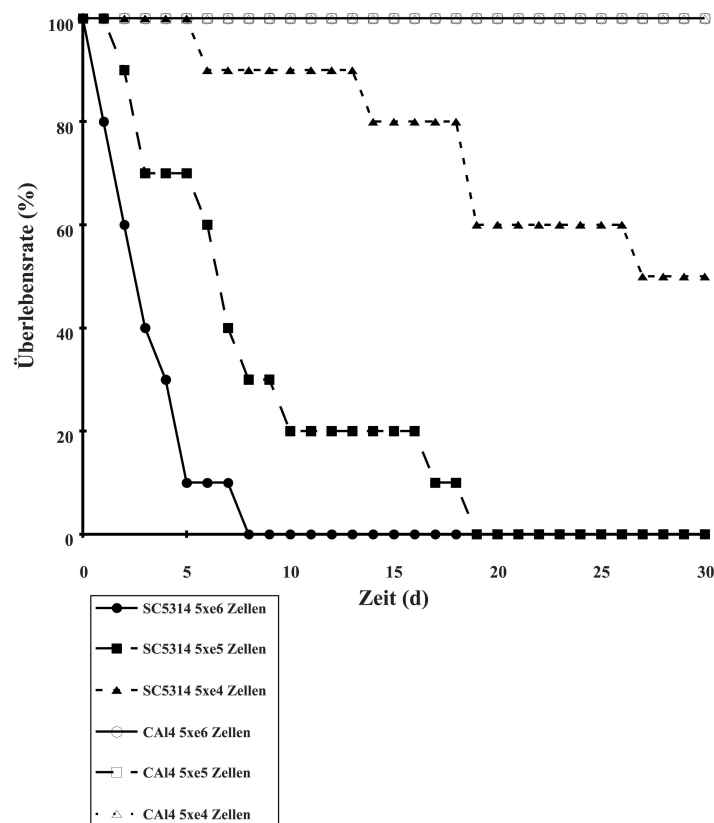


Abbildung 10: Vergleich der Virulenz der Wildtypstämme SC5314 und CAI4 über 30 Tage mit je drei verschiedenen Injektionsdosen (n = 10).

Der Uridin-auxotrophe Wildtypstamm CAI4 zeigte bei allen drei getesteten Konzentrationen keine Virulenz, die Überlebensrate betrug jeweils 100 %. Die Expression des *URA3*-Markergens der *URA3*-Flipper-Kassette ist von seiner Lokalisierung im Genom abhängig und kann zu variabler Virulenz führen. Um auszuschließen, dass die verminderte Virulenz der homozygoten Deletionsmutanten von einer verminderten Expression des *URA3*-Markergens resultierte, wurden alle homozygoten Deletionsmutanten (CANYV1D, CAVAC8D, CAVAM3D, CAVAM7D, CAVPS33D, CAVPS41D, CAVTC1D, CAVTC3/2D, CAVTC4D und CAYPT7D) mit den zugehörigen heterozygoten Mutanten (CANYV1S, CAVAC8S,

CAVAM3S, CAVAM7S, CAVPS33S, CAVPS41S, CAVTC1S, CAVTC3/2S, CAVTC4S und CAYPT7S) verglichen, denn diese tragen das *URA3*-Gen an exakt demselben Locus.

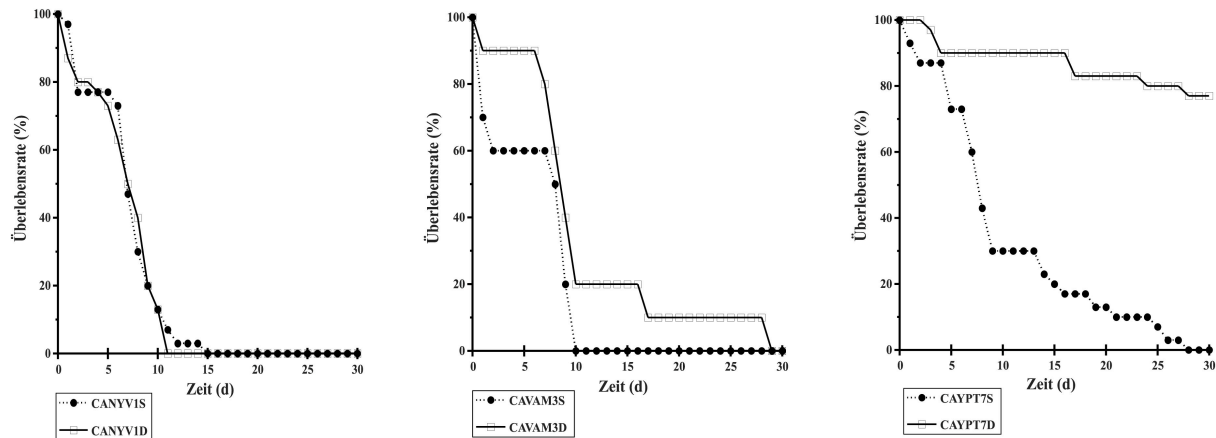


Abbildung 11: Vergleich der Virulenz von heterozygoten und entsprechenden homozygoten Deletionsmutanten (CANYV1S und CANYV1D, CAVAM3S und CAVAM3D, CAYPT7S und CAYPT7D) über 30 Tage mit je 5×10^6 Zellen Injektionsdosis ($n = 10$).

Auch bei diesem Versuch waren die Ergebnisse der Stämme CANYV1S/CANYV1D, CAVAC8S/CAVAC8D, CAVAM7S/CAVAM7D, CAVPS33S/CAVPS33D, CAVPS41S/CAVPS41D, CAVTC1S/CAVTC1D, CAVTC3/2S/CAVTC3/2D und CAVTC4S/CAVTC4D ohne nennenswerte Unterschiede. Abbildung 11 zeigt wiederum beispielhaft den Virulenzvergleich für *CaNYV1*.

Der Vergleich bestätigte jedoch, dass die Deletion des Gens *CaVAM3* zu einer schwachen Reduktion der Virulenz führte und die Deletion des Gens *CaYPT7* die Virulenz signifikant senkte. Die Minderung der Virulenz von CAYPT7D korreliert mit dem Grad der Vakuolenfragmentierung und daher allgemein mit dem Grad der Vakuolenfunktion des betreffenden Stammes.

Da die Deletion des Gens *CaYPT7* den größten Effekt auf die Virulenz zeigte, wurden von diesem Stamm weitere Konstrukte angefertigt und getestet. Zum einen sollte eine Knock-out-Mutante hergestellt werden, die anstelle beider Wildtypallele je eine *FRT*-Seite trägt. Dazu wurde der Stamm CAYPT7R mit der *URA3-Flipper*-Kassette transformiert, um das noch vorhandene Wildtypallel durch die Kassette zu ersetzen. Durch Induktion des *SAP2*-Promoters in YCB-BSA-Medium sollte sich die *URA3-Flipper*-Kassette ausschneiden, so dass nur eine *FRT*-Stelle übrigbliebe. Leider war dieser Vorgang wohl letal und das gewünschte Konstrukt konnte nicht hergestellt werden. Weiter wurde durch Transformation des Stammes

CAYPT7D mit dem Plasmid pYPT7rev die Revertierungsmutante CAYPT7Re konstruiert, die eine *FRT*-Sequenz und das Wildtypgen zusammen mit dem *URA3*-Marker gen besitzt.

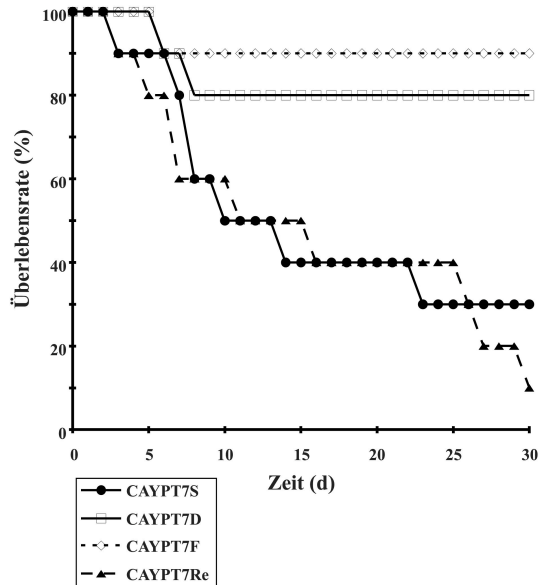


Abbildung 12: Vergleich der Virulenz von heterozygoten (CAYPT7S) und homozygoten Deletionsmutanten (CAYPT7D und CAYPT7F) und der Revertierungsmutante (CAYPT7Re) über 30 Tage mit je 5×10^6 Zellen Injektionsdosis ($n = 10$).

Während die Stämme, die noch ein Wildtypallel tragen mit 10 % Überlebensrate bei der Revertierungsmutante CAYPT7Re und 30 % Überlebensrate bei der heterozygoten Deletionsmutante CAYPT7S eine relativ hohe Virulenz zeigten, waren die homozygoten Deletionsmutanten CAYPT7D und CAYPT7F mit 80 % bzw. 90 % Überlebensrate kaum mehr infektiös (s. Abbildung 12). Die Wiedereinführung des *CaYPT7*-Wildtypgens in die homozygote Deletionsmutante CAYPT7D stellte deren Virulenz völlig wieder her und brachte sie auf das Niveau der heterozygoten Mutante CAYPT7S, die auch über ein *CaYPT7*-Gen verfügt.

3.1.5 Induktion der Hyphenbildung

Um der Frage nachzugehen, welche Ursache die verminderte Virulenz der *CaYPT7*-Deletionsmutanten haben könnte, wurde die Induktion der Hyphenbildung untersucht. Der sog. Yeast-to-Hyphae-Übergang zählt zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von *Candida albicans*. Die Hyphenbildung geht mit einer schnellen Zunahme des Vakuolenvolumens durch Migration von cytoplasmatischem Material in die Hyphenspitze einher. Während die Einzelzellen (sog. Yeast-Form) für die Verteilung und Verbreitung des Krankheitserregers durch den Blutstrom ausschlaggebend sind, wird die Adhäsion an und die Invasion in humanes Gewebe

durch den Wechsel von Einzelzellen zu filamentösem Wachstum (Hyphal-Form) erleichtert, denn die phänotypischen Änderungen beeinflussen die Anheftungseigenschaften, die Antigenexpression und die Gewebeaffinität durch Expression bestimmter Zellwandproteine.

Die Hypheninduktion wurde in Flüssigkultur über einen Zeitraum von 6 bzw. 10 Stunden wie in Material und Methoden 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Da die CAYPT7-Stämme bei den Infektionsexperimenten den größten Effekt zeigten, wurde die Hyphenbildung beispielhaft bei diesen Stämmen im Vergleich zu den Wildtypstämmen SC5314 und CAI4 untersucht. Abbildung 13 zeigt das mikroskopische Erscheinen der Zellen zu verschiedenen Induktionszeitpunkten.

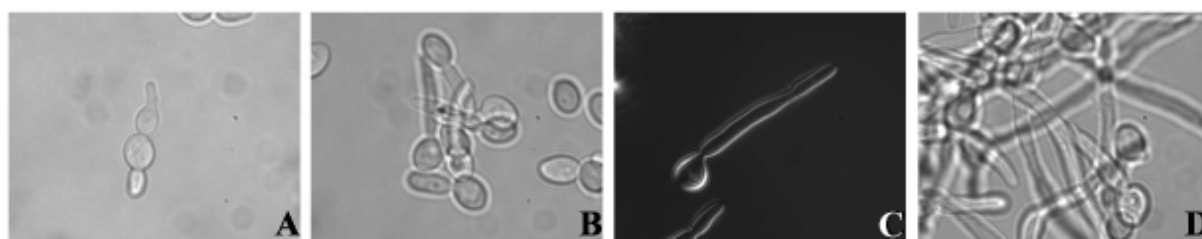


Abbildung 13: Yeast-to-Hyphae-Übergang.

A) Hyphenbildung in Flüssigkultur nach 1 h Induktion mit 10 % FCS bei 37 °C; B) nach 2 h Induktion; C) nach 3 h Induktion; D) nach 4 h Induktion.

Es wurde die prozentuale Anzahl der hyphenbildenden Zellen über die Zeit beobachtet. Wie aus Abbildung 14 und Abbildung 15 ersichtlich ist, stieg die Zahl der hyphenbildenden Zellen in allen Stämmen nach Zugabe von Serum und Erhöhung der Temperatur auf 37 °C rasch an. Sowohl die Wildtypstämmen als auch die heterozygoten und homozygoten Deletionsmutanten verhielten sich sehr ähnlich. Die Zellen bildeten schnell schlauchartige Fortsätze, die bereits nach 30 Minuten zu erkennen waren. Nach 1-2 Stunden hatten sich die meisten Schläuche zu parallelwandigen echten Hyphen mit Septen ausgedehnt. Nach 2-4 Stunden zeigten fast alle Zellen filamentöses Wachstum, nach 6 Stunden konnten auch einige Pseudohyphen beobachtet werden. Da die Zellen kein Gewebe oder künstliches Material zum Anheften finden konnten, nahm die Hyphenbildung nach 6 Stunden stetig ab. Nach 10 Stunden waren 85 % der Zellen wieder zur Yeast-Form zurückgekehrt. Die Hyphen stiegen bis zu einer Länge von 16-19 µm mit einem Höchstwert zwischen 5-8 Stunden Induktion.

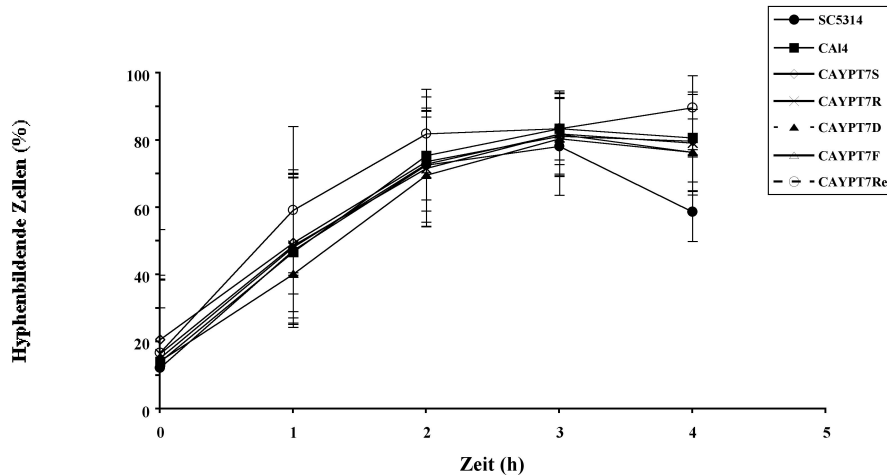


Abbildung 14: Hyphenbildung der Wildtypen und aller CAYPT7-Mutanten über 4 Stunden.

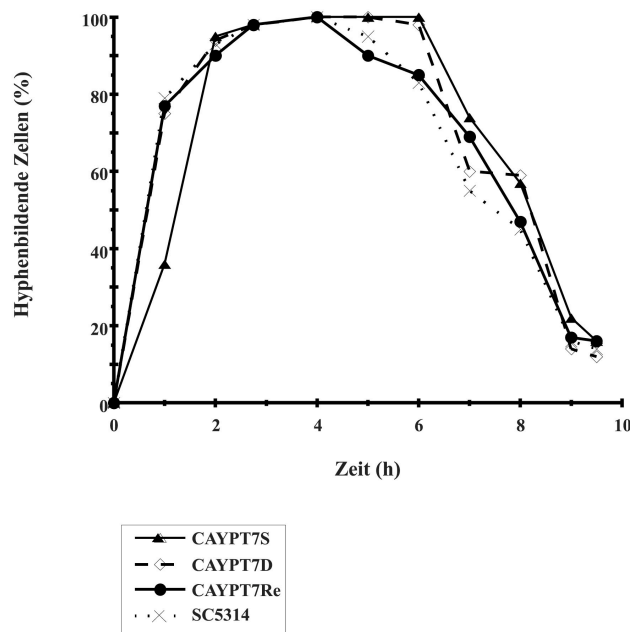


Abbildung 15: Hyphenbildung des Wildtyps SC5314 und einiger CAYPT7-Mutanten über 10 Stunden.

Neben der Hyphenbildung an sich wurde auch die maximale Länge der Hyphen gemessen. Hier zeigten sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen. Während der ersten zwei Stunden Induktion bildeten alle Zellen Hyphen gleicher Länge. Nach drei Stunden

bildete die homozygote Deletionsmutante (CAYPT7D) nur sehr kleine Hyphen (maximal 8 μm nach 4 Stunden Induktion, die nach 10 Stunden auf 5 μm zurückgingen), während die heterozygote Deletionsmutante (CAYPT7S) und der revertierte Stamm CAYPT7Re deutlich normal lange Hyphen aufwies (15 μm nach 5 Stunden Induktion) (s. Abbildung 16). Klar zu sehen war, dass die Hyphen der homozygoten Deletionsmutante auch über 10 Stunden Induktionszeit zu keinem Zeitpunkt die Länge der anderen Stämme erreichten (s. Abbildung 17). Die Untersuchung der Hyphenbildung zeigte, dass die Vakuolenintegrität für die Hyphenextension wichtig ist und die maximale Hyphenlänge mit der Infektiösität der genannten Stämme korreliert.

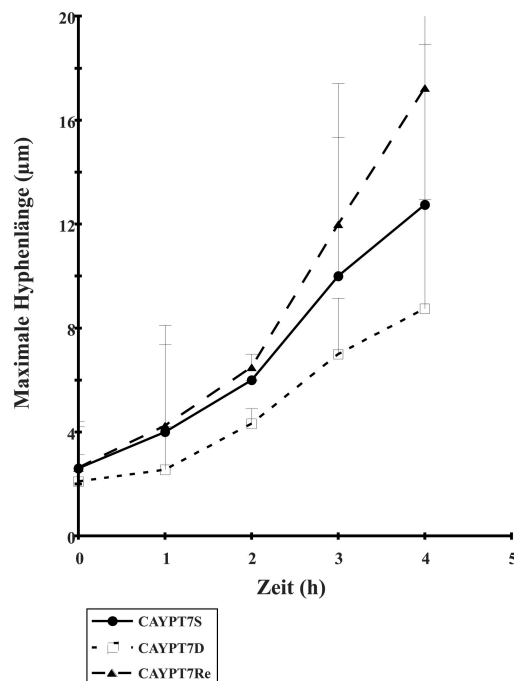


Abbildung 16: Maximale Hyphenlänge der CAYPT7-Mutanten über 4 Stunden.

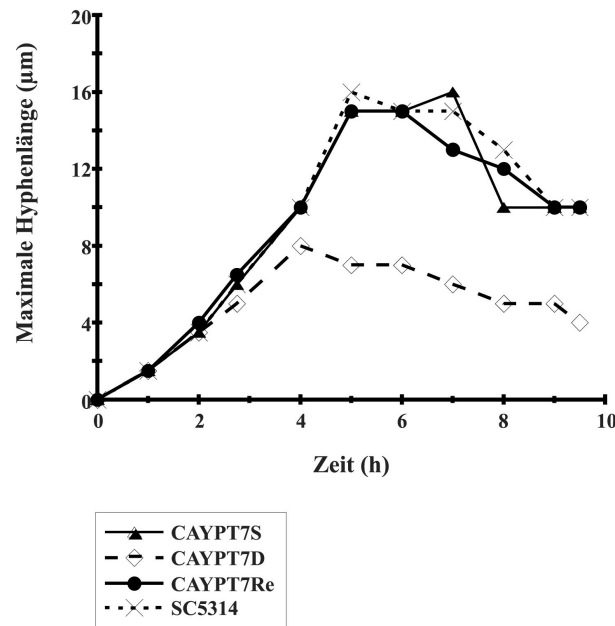


Abbildung 17: Maximale Hyphenlänge des Wildtyps SC5314 und einiger *CAYPT7*-Mutanten über 10 Stunden.

3.2 Ergebnisse: Autophagie bei Tumorzellen

3.2.1 Senkung der mRNA-Expression durch siGENOME SMARTpool -Reagenzien

Es wurden sechs autophagische Kandidatengene ausgewählt (*BECLIN1*, *APG3*, *APG4B*, *APG4C*, *APG5* und *APG12*), die mittels siRNAs gehemmt werden sollten. Alle Target-siRNAs und Kontroll-siRNAs (siCONTROL non-targeting-siRNA und siGLO RISC-free-siRNA) konnten kommerziell bei derselben Firma (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) erworben werden (s. Tabelle 9), so dass die Transfektion immer einheitlich durchgeführt werden konnte.

Durch die Transfektion der siGENOME SMARTpool-Reagenzien sollte selektiv die zur siRNA komplementäre mRNA abgebaut werden. Die Effizienz aller sechs siGENOME SMARTpool-Reagenzien wurde nach der Transfektion in allen vier Zelllinien mittels RT-PCR überprüft. Dazu wurde aus transfizierten Zellen die zelluläre Gesamt-RNA isoliert, photometrisch gemessen und für die RT-PCR eingesetzt. Für den Nachweis eines jeden Gens wurde eine One-Step-PCR-Reaktion aus cDNA-Umschreibung (RT-Reaktion) und anschließender PCR mit entsprechenden Primern angesetzt (s. Tabelle 10 und Tabelle 11). Als

Kontrollen dienten untransfizierte Zellen, Transfektion mit sterilem RNase-freiem H₂O und Transfektion mit si*CONTROL* non-targeting siRNA. Abbildung 18 zeigt beispielhaft anhand siGENOME SMARTpool *APG4C* siRNA, dass die Transfektion mit den siGENOME SMARTpool-Reagenzien den mRNA-Gehalt signifikant reduziert.

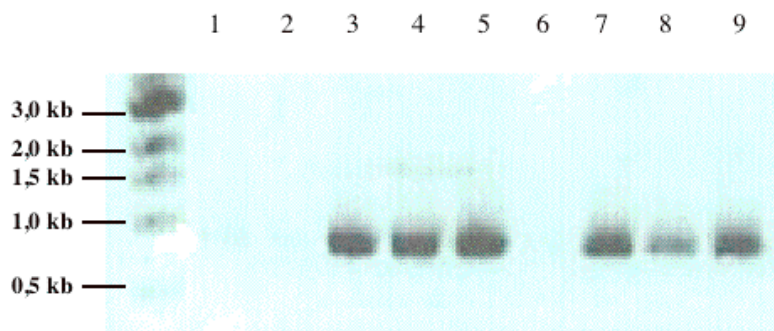


Abbildung 18: RT-PCR zur Kontrolle des mRNA-Gehalts von transfizierten Zellen am Beispiel von *APG4C*.

1 (Referenz-PCR ohne Enzyme), 2 (MDA-MB-321, transfiziert mit siGENOME SMARTpool *APG4C* siRNA), 3 (MDA-MB-231, untransfiziert), 4 (MDA-MB-231, transfiziert mit sterilem RNase-freiem H₂O), 5 (MDA-MB-231, transfiziert mit si*CONTROL* non-targeting siRNA), 6 (A549, transfiziert mit siGENOME SMARTpool *APG4C* siRNA), 7 (A549, untransfiziert), 8 (A549, transfiziert mit sterilem RNase-freiem H₂O), 9 (A549, transfiziert mit si*CONTROL* non-targeting siRNA).

3.2.2 Dauer der Transfektionswirkung auf RNA-Level

Nicht nur die Effektivität der siRNAs, sondern auch die Dauer des hervorgerufenen Effekts wurde getestet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollte die selektive Hemmung der mRNA-Expression ca. 1 Woche anhalten. Bei einem kürzeren Wirkzeitraum müsste man eine Zweittransfektion in Betracht ziehen, die allerdings einen zusätzlichen zellulären Stressfaktor darstellen würde.

Die Zellen wurden transfiziert, und zu bestimmten Zeitpunkten (1, 5, 8, 11, 14 und 19 Tage nach Transfektion) wurde die gesamte zelluläre RNA mit Hilfe des E.Z.N.A. Total RNA Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) isoliert. In einer RT-PCR-Reaktion mit 0,2-0,5 µg RNA konnte der mRNA-Gehalt der entsprechenden Gene bestimmt werden. Abbildung 19 zeigt, dass die zelluläre mRNA-Expression nach der Transfektion über 5-8 Tage stabil gehemmt wurde. 8-11 Tage nach der Transfektion stieg die mRNA-Expression langsam wieder an und erreichte nach 14, spätestens 19 Tagen wieder ihren normalen Expressionsgehalt, d.h. die siRNA zeigt keine Effekte mehr. Da diese RT-PCR nicht quantitativ

war, wurde immer ein zweiter Ansatz mit *GAPDH*-Primern als interner Standard benutzt. Die durch siRNAs erzielte Hemmung der mRNA-Expression entspricht der erwarteten Dauer von ca. 1 Woche.

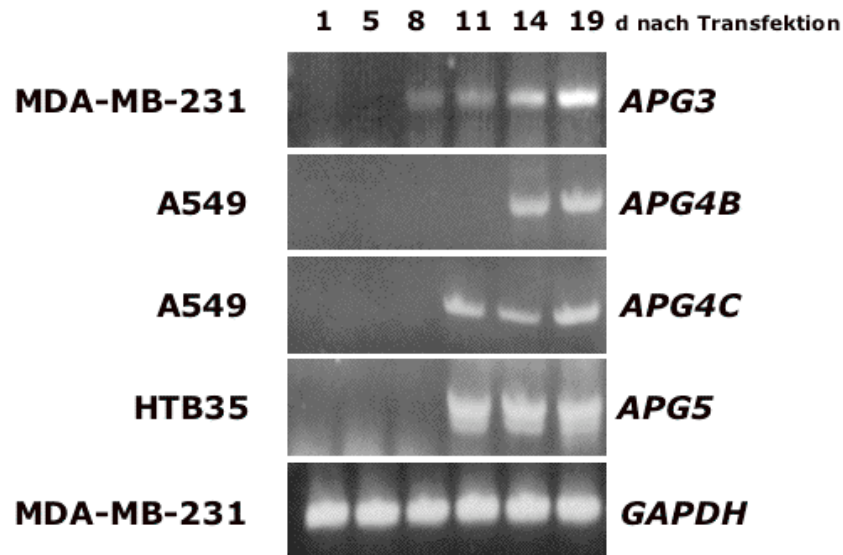


Abbildung 19: Dauer des RNAi-Effekts.

Die zelluläre mRNA wurde 1, 5, 8, 11, 14 und 19 Tage nach der Transfektion mit siGENOME SMARTpool siRNA *APG3*, *APG4B*, *APG4C* und *APG5* isoliert. Der RNA-Gehalt wurde mittels RT-PCR kontrolliert, dieselbe Reaktion mit *GAPDH*-Primern diente als interner Standard.

3.2.3 Auswirkung von Bestrahlung auf die mRNA-Expression der Autophagie-Gene

Wenn Bestrahlung Autophagie induziert, sollte ein Anstieg im mRNA-Gehalt der Autophagie-Gene zu beobachten sein. Um die Auswirkung von Bestrahlung auf die mRNA-Expression der Gene zu untersuchen, wurden die Zellen mit Einzeldosen 2, 4 und 10 Gy bestrahlt. 2 Stunden nach der Bestrahlung wurde die zelluläre RNA isoliert und per RT-PCR getestet. Abbildung 20 zeigt exemplarisch für A549-Zellen die Induktion der Autophagie nach Bestrahlung anhand der Expression der *APG4B*-RNA.

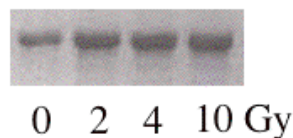


Abbildung 20: mRNA-Induktion nach verschiedenen Bestrahlungsdosen.

A549-Zellen wurden mit Dosen von 0, 2, 4 und 10 Gy bestrahlt, 2 Stunden nach der Bestrahlung wurde die zelluläre RNA isoliert und per RT-PCR die Expression von *APG4B* getestet.

Die RT-PCR mittels One-Step-PCR-Kit erwies sich als zu ungenau für diese Fragestellung, so dass zusätzlich eine LightCycler[®]-PCR zu Quantifizierung der Genexpression durchgeführt wurde. Dazu wurde je 1 µg RNA mittels AMV-Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, und diese wurde per LightCycler[®]-PCR analysiert. Da die Expressionswerte gegen *GAPDH* normalisiert wurden, gibt Abbildung 21 das Mittel der relativen Genexpression aus zwei unabhängigen Versuchen wieder.

In allen Zelllinien konnte man eine lineare dosisabhängige Expressionszunahme autophagischer Gene beobachten. Die Bestrahlung mit allen 3 getesteten Dosen verursachte einen Anstieg der RNA-Expression verglichen zur unbestrahlten Kontrolle. 2 Gy stellt die sog. therapeutische Dosis dar. Da hier gezeigt wurde, dass Bestrahlung mit 2 Gy bereits eine eindeutige Autophagie-Induktion bewirkte, wurden die nachfolgenden Experimente mit 2 Gy durchgeführt.

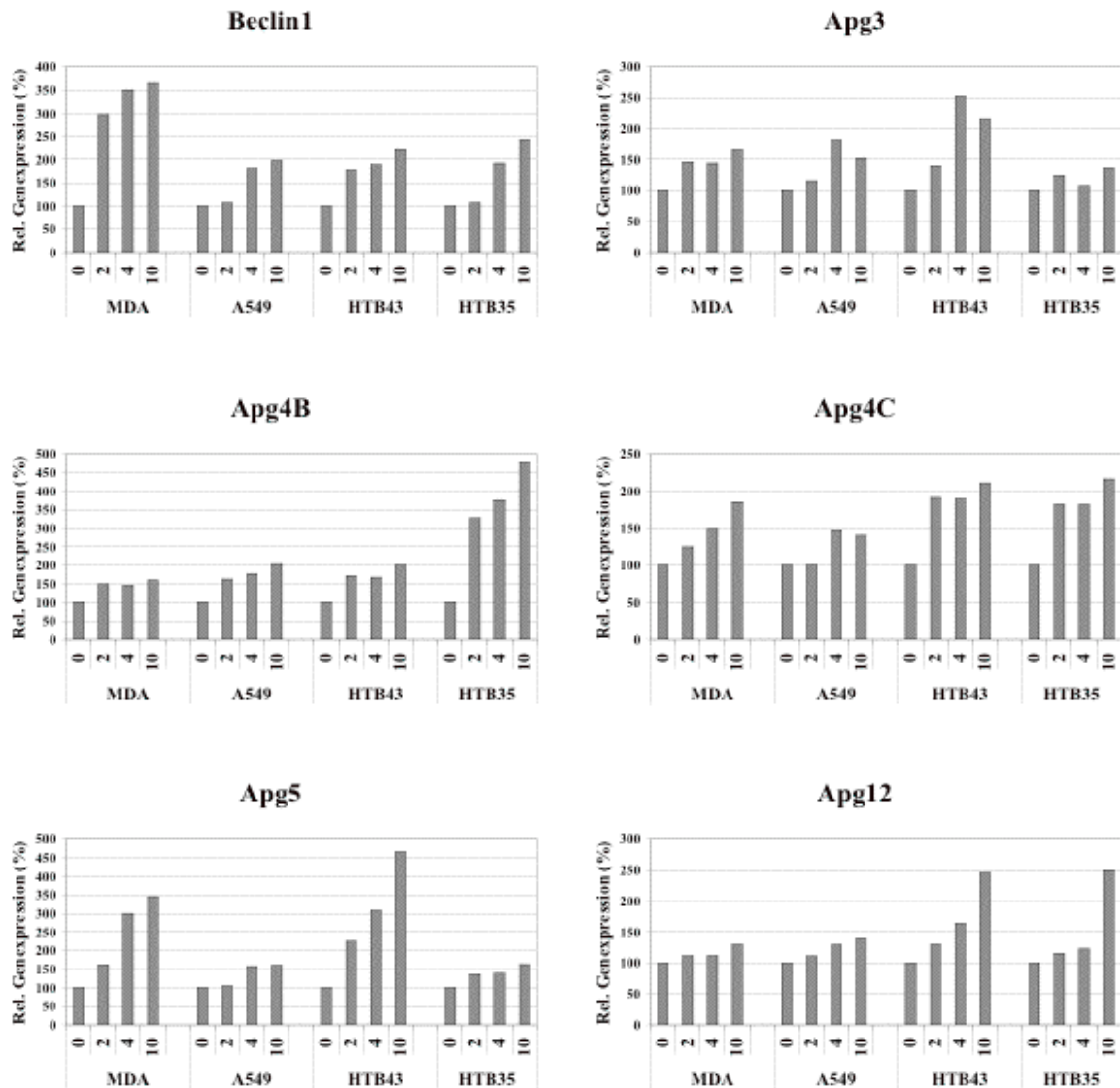


Abbildung 21: LightCycler[®]-Analyse der mRNA-Induktion nach verschiedenen Bestrahlungsdosen.

MDA-MB-231, A549, HTB43 und HTB35 wurden mit verschiedenen Dosen (0, 2, 4 und 10 Gy) bestrahlt. 2 Stunden nach der Bestrahlung wurde die zelluläre RNA isoliert und per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression wurde quantitativ mittels LightCycler[®]-PCR analysiert und gegen *GAPDH* normalisiert. Der Graph zeigt das Mittel aus zwei unabhängigen Versuchen.

Auch der Zeitverlauf der Autophagie-Induktion bzw. der mRNA-Expression wurde nach Bestrahlung geprüft. Dazu wurden Zellen mit 2 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung die zelluläre RNA isoliert und für die RT-PCR verwendet. Abbildung 22 zeigt am Beispiel von *APG4B*, dass die RNA-Produktion der Autophagie-Gene bereits 30 min nach Bestrahlung induziert wurde und diese Aktivierung über mindestens 8 Stunden an-

dauerte. 24 Stunden nach der Bestrahlung jedoch erreichte der RNA-Gehalt wieder den Status unbestrahlter Zellen.

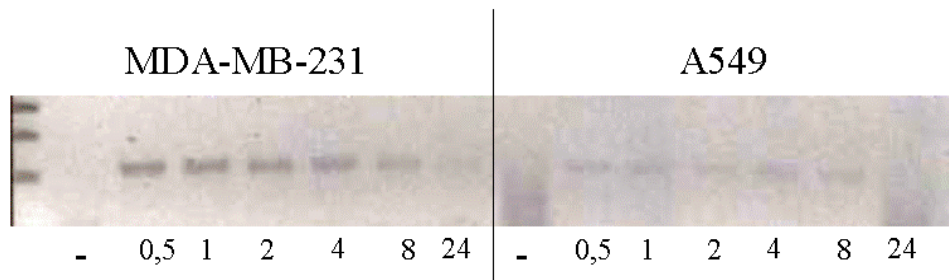


Abbildung 22: Zeitverlauf der mRNA-Induktion nach Bestrahlung.

MDA-MB-231 und A549 wurden mit 2 Gy bestrahlt. 0,5, 1, 2, 4, 8 und 24 h nach der Bestrahlung wurde die zelluläre RNA isoliert und die Expression der *APG4B*-RNA mittels RT-PCR nachgewiesen.

Dieselbe Analyse wurde ebenfalls mit LightCycler[®]-PCR zur genauen Quantifizierung wiederholt. Abbildung 23 zeigt wiederum das gegen *GAPDH* normalisierte Mittel der relativen Genexpression aus zwei unabhängigen Versuchen. Der in Abbildung 22 angedeutete Verlauf spiegelt sich für einzelne Genen und Zelllinien wieder, so zum Beispiel für *APG4B* in MDA-MB-231 und HTB43, *APG4C* in MDA-MB-231 und A549, *APG5* in MDA-MB-231 und HTB35 und *APG12* in MDA-MB-231 und HTB43.

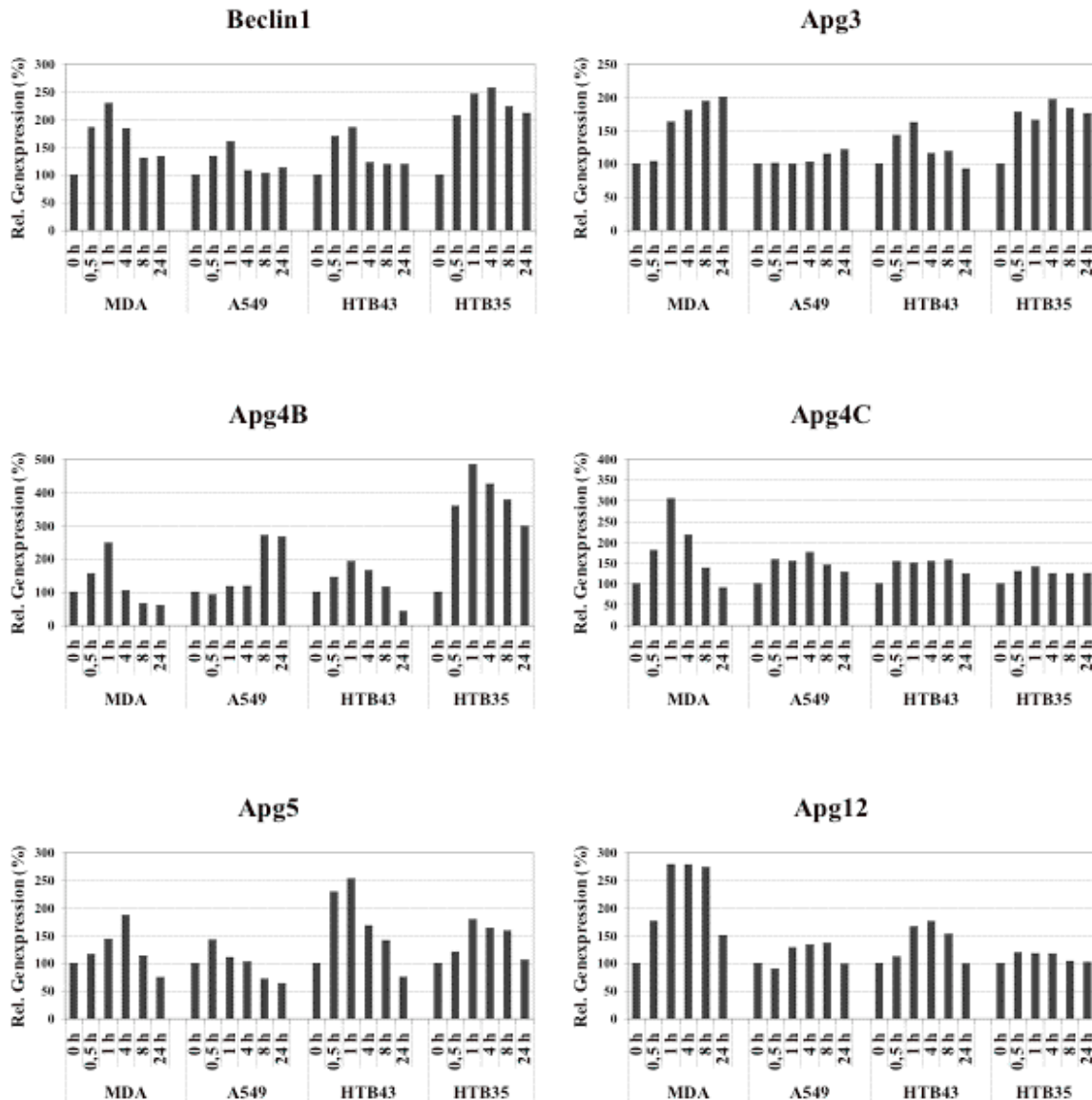


Abbildung 23: LightCycler®-Analyse der zeitlichen mRNA-Induktion nach Bestrahlung.

MDA-MB-231, A549, HTB43 und HTB35 wurden mit 2 Gy bestrahlt. 0,5, 1, 4, 8 und 24 h nach der Bestrahlung wurde die zelluläre RNA isoliert und per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression wurde quantitativ mittels LightCycler®-PCR analysiert und gegen *GAPDH* normalisiert. Der Graph zeigt das Mittel aus zwei unabhängigen Versuchen.

3.2.4 Senkung der Proteinexpression durch siGENOME SMARTpool *BECLIN1*-siRNA

Die Transfektionseffizienz sollte nicht nur auf RNA- sondern auch auf Proteinebene überprüft werden. Allerdings sind Antikörper zu humanen Autophagie-Genen kommerziell nur bedingt

erhältlich. So konnten nur Antikörper gegen humanes Beclin1p und Apg5p erworben werden. Leider erkannte weder der Apg5-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) noch der von USBiological (Swampscott, MA, USA) die richtige Proteinbande, so dass als einziger Nachweis der Transfektion auf Proteinebene der Beclin1p-Antikörper von BD Biosciences (Heidelberg, Germany) blieb.

Die Transfektion wurde in allen vier Zelllinien mittels Western Blot überprüft. Als Kontrollen dienten untransfizierte Zellen und mit siCONTROL non-targeting siRNA transfizierte Zellen. β -Aktin diente als Ladekontrolle, deren Schwankungen bei der densitometrischen Auswertung der Banden einberechnet wurden. Abbildung 24 zeigt anhand A549-Zellen, dass die Transfektion mit siGENOME SMARTpool *BECLIN1*-siRNA die Proteinexpression signifikant reduzierte. Die Reduktion begann 2 Tage nach der Transfektion und war über mindestens 7 Tage stabil.

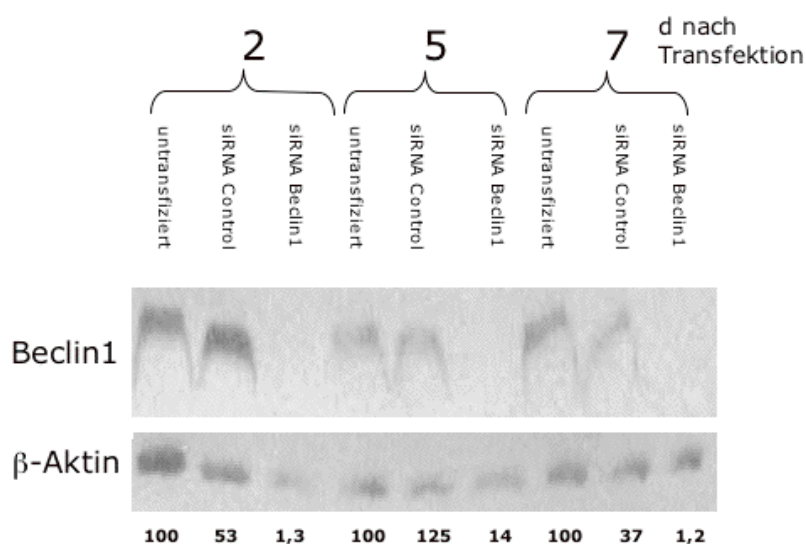


Abbildung 24: Beclin1- Proteinexpression in A549 Zellen nach Transfektion.

Zelluläres Gesamtprotein wurde 2, 5 und 7 Tage nach der Transfektion mit siGENOME SMARTpool siRNA *BECLIN1* oder siCONTROL non-targeting siRNA isoliert, im 14 % SDS-Gel aufgetrennt und per Western Blot nachgewiesen. β -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde zur densitometrischen Auswertung miteinberechnet.

3.2.5 Dauer der Transfektionswirkung auf Protein-Level

Auf Proteinebene wurde ebenfalls neben der Effektivität auch die Dauer des durch RNAi hervorgerufenen Effekts geprüft. Dazu wurden Zellen transfiziert und zu bestimmten Zeitpunkten (2, 4, 6, 9, 11 und 14 Tage nach Transfektion) das zelluläre Gesamtprotein isoliert. 100 μ g Protein wurden einer Methanol-Chloroform-Extraktion unterzogen und auf einem 14 % SDS-

Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Blotten wurde die Membran gegen Beclin1p und danach gegen α -Aktin als interne Kontrolle dekoriert. Abbildung 25 zeigt, dass Transfektion mit *siCONTROL* non-targeting siRNA in allen vier Zelllinien einer relativ gleichmäßigen Beclin1p-Proteinexpression resultierte. Dagegen führte die Transfektion mit *BECLINI*-siRNA zu einer stabilen Expressionshemmung über 4-9 Tage. 6-9 Tage nach der Transfektion stieg die Proteinmenge sehr langsam wieder an und erreichte erst nach 11-14 Tagen wieder ihr normales Expressionsniveau. Der Nachweis dieser langen RNAi-Wirkung auf Proteinebene ist für den Koloniebildungstest sehr bedeutend.

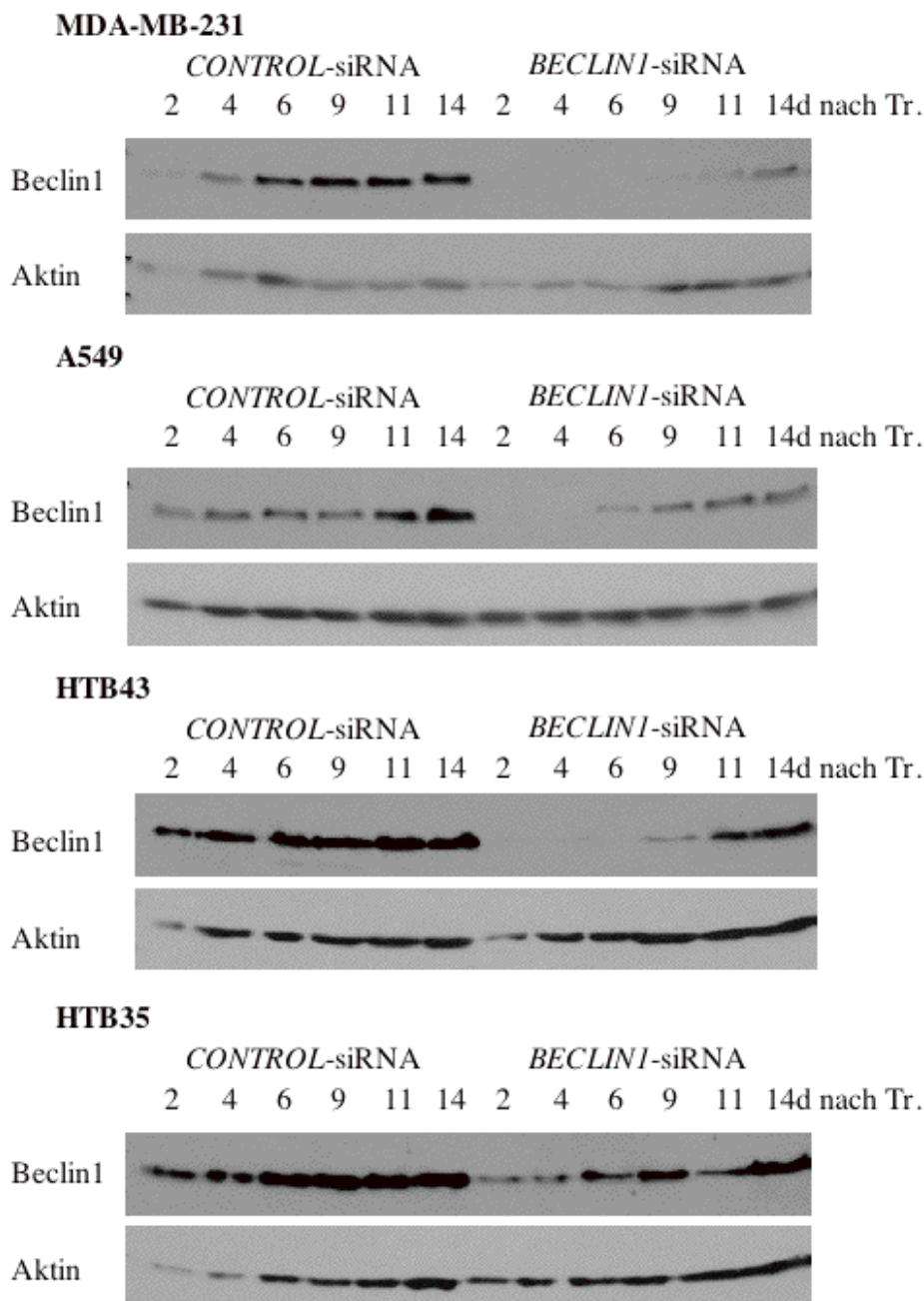


Abbildung 25: Dauer des RNAi-Effekts auf Proteinebene.

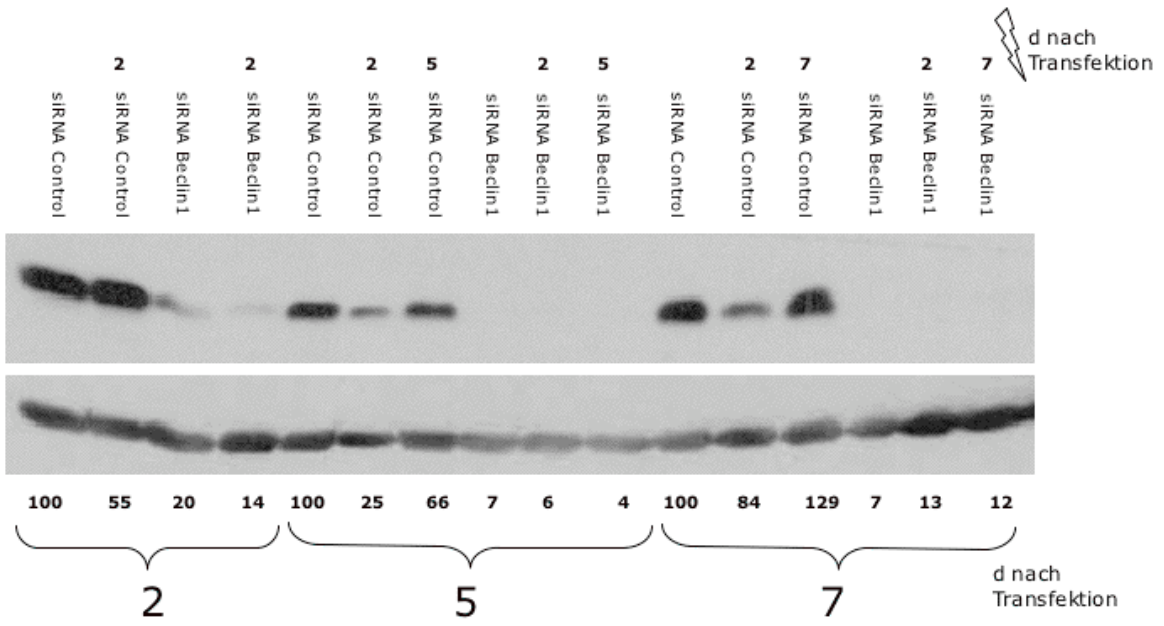
Zelluläres Gesamtprotein wurde 2, 4, 6, 9, 11 und 14 Tage nach der Transfektion mit siGENOME SMARTpool siRNA *BECLINI* bzw. si*CONTROL* non-targeting siRNA isoliert. Die Beclin1-Proteinexpression wurde mittels Western Blot kontrolliert. α -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2.6 Auswirkung von Bestrahlung auf die Beclin1-Proteinexpression

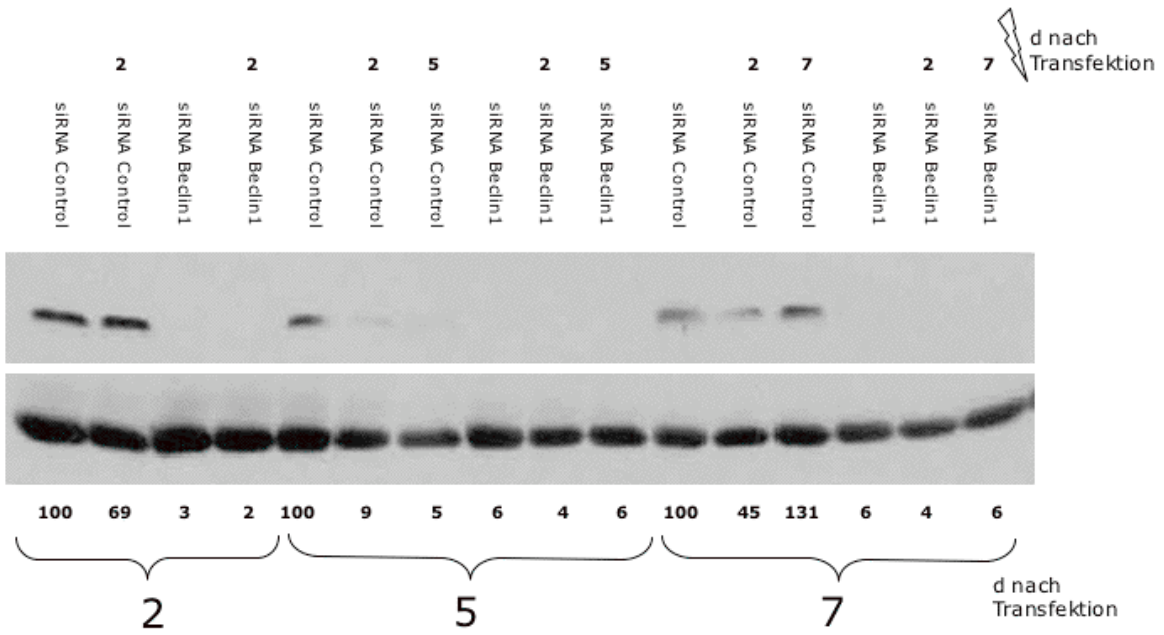
Bestrahlung verursachte auf RNA-Ebene die Induktion der Autophagie, die durch eine erhöhte RNA-Expression nachgewiesen werden konnte. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch auf Proteinebene erwartet.

Die Zellen aller 4 Zelllinien wurden mit siGENOME SMARTpool siRNA *BECLINI* oder si*CONTROL* non-targeting siRNA transfiziert. 2, 5 und 7 Tage nach der Transfektion wurde jeweils 1 Ansatz bestrahlt und 4 Stunden nach der Bestrahlung wurde zelluläres Gesamtprotein isoliert. In Abbildung 26A-D wird wiederum deutlich die Hemmung der Beclin1p-Proteinexpression durch RNAi wie in den vorigen Versuchen bestätigt. Im Gegensatz zum Anstieg der RNA-Expression nach Bestrahlung scheint die Beclin1p-Proteinexpression durch Bestrahlung jedoch zu sinken. Leider ließ sich aufgrund fehlender Antikörper nicht prüfen, ob bei den anderen autophagischen Kandidatengenen eine Aktivierung der Proteinexpression erfolgte.

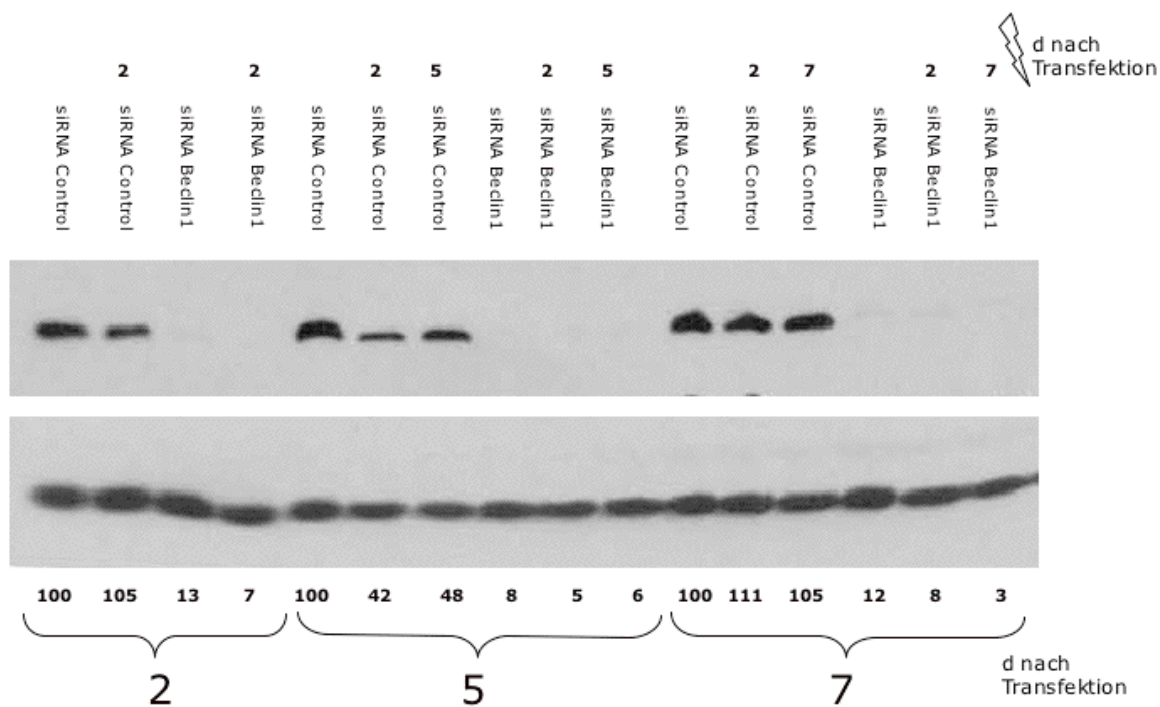
26A



26B



26C



26D

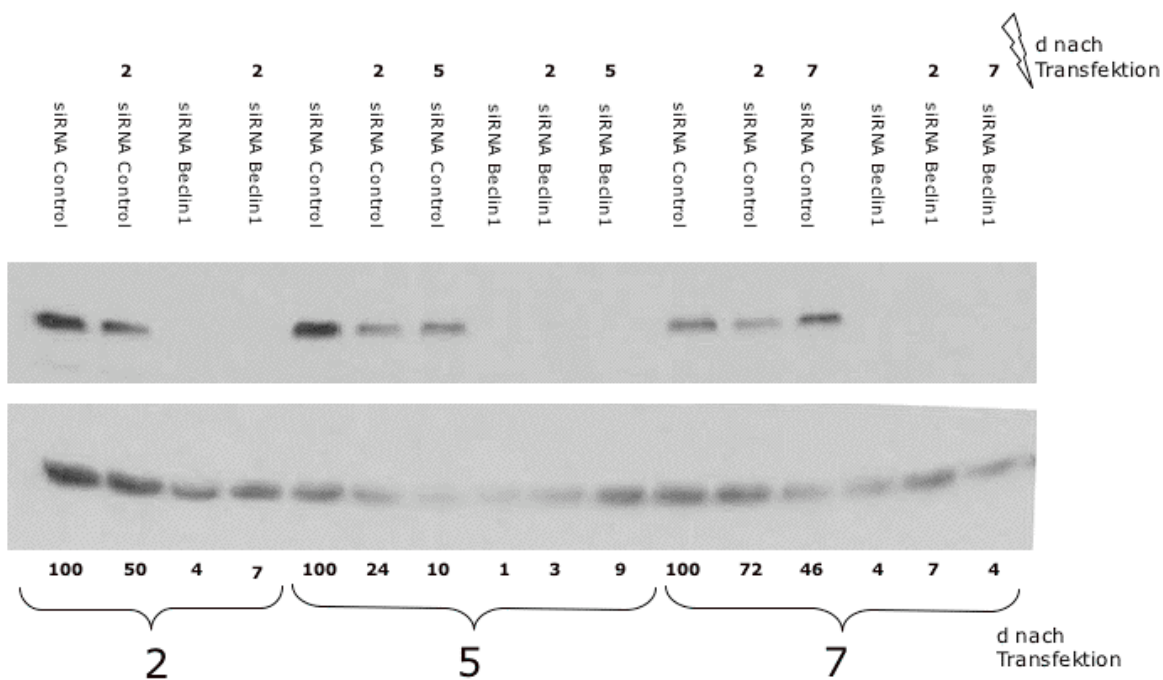


Abbildung 26A-D: Proteinexpression nach Bestrahlung.

MDA-MB-231 (A), A549 (B), HTB43 (C) und HTB35 (D) wurden mit siGENOME SMARTpool siRNA *BECLIN1* oder siCONTROL non-targeting siRNA transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion mit einer Einzeldosis von 2 Gy bestrahlt. Jeweils 4 Stunden nach der Bestrahlung wurde zelluläres Gesamtprotein isoliert

und für Western Blot verwendet. Der obere Blot zeigt jeweils Beclin1-Antikörper, der untere β -Aktin-Antikörper.

3.2.7 Zeitliche Induktion der Vesikelbildung nach Bestrahlung in den vier Zelllinien (TEM)

Elektronenmikroskopie ist immer noch die geeignetste Methode zur Visualisierung der Autophagie (Mizushima, 2004). Wenn Bestrahlung Autophagie auslöst, müsste dies in der Bildung autophagischer Vesikel nachzuweisen sein. Die Induktion der Autophagie hilft den Zellen, beschädigte Zellbestandteile und Organellen zu eliminieren, bevor deren Anreicherung den apoptotischen Zelltod auslösen könnte. Autophagische Vesikel unterscheiden sich gegenüber anderen intrazellulären Vesikeln durch eine Doppelmembran.

Alle vier Zelllinien wurden auf ihre Fähigkeit zur Bildung autophagischer Vesikel getestet. Dazu wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung fixiert (1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden). Wie Abbildung 27 zeigt, konnte elektronenmikroskopisch ein Basislevel an Autophagie auch in unbestrahlten Zellen beobachtet werden. Ein Anstieg der Vesikel wurde hauptsächlich 2-4 Stunden nach Bestrahlung induziert. Morphologisch konnten in frühen Autophagie-Stadien das autophagozytierte Material in den Vesikeln als konzentrische, multilamelleäre oder multivesikuläre Strukturen identifiziert werden. 8-12 Stunden nach der Bestrahlung wurde der eingeschlossene Vesikelinhalt allmählich konzentriert und abgebaut, die angereicherten Vesikel erschienen in späten Stadien elektronendicht. 24 Stunden nach der Bestrahlung schienen alle beschädigten Zellbestandteile per Autophagie beseitigt worden zu sein, und die Zelle hatte den Basislevel wieder erreicht.

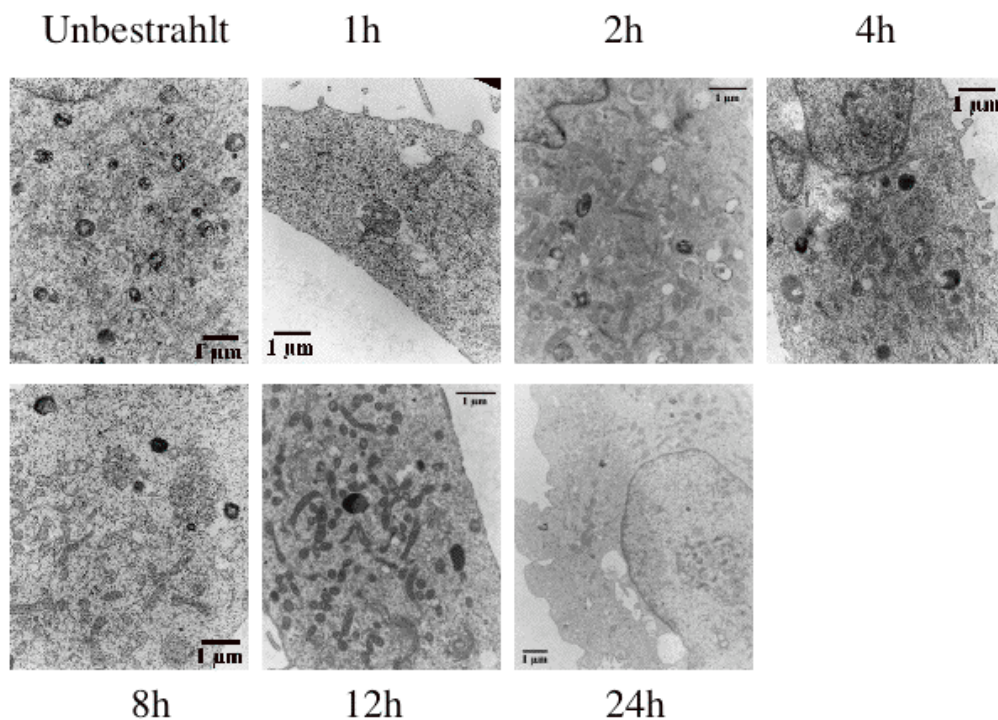


Abbildung 27A: Zeitliche Induktion autophagischer Vesikel nach Bestrahlung.

MDA-MB-231 wurden mit 2 Gy bestrahlt und nach 1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden fixiert. Unbestrahlte Zellen dienten als Vergleich.

In Abbildung 27B-D wurde derselbe Versuch mit A549, HTB43 und HTB35 durchgeführt. In A549 und HTB35 ließ sich Autophagie durch Bestrahlung kaum induzieren. HTB43-Zellen zeigten zwar eine Autophagie-Induktion, jedoch eigneten sich die Zellen nicht zur Mikroskopie. Die Zellen wuchsen zwar adhärent, lösten sich aber sehr leicht vom Untergrund, wodurch meist nur ein Bruchteil der ursprünglich vorhandenen Zellen fixiert werden konnte. Bei einer so geringen Zelldichte erwies sich die Probenpräparation zur Elektronenmikroskopie als sehr aufwendig und schwierig. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die weiteren Versuche mit MDA-MB-231 durchgeführt.

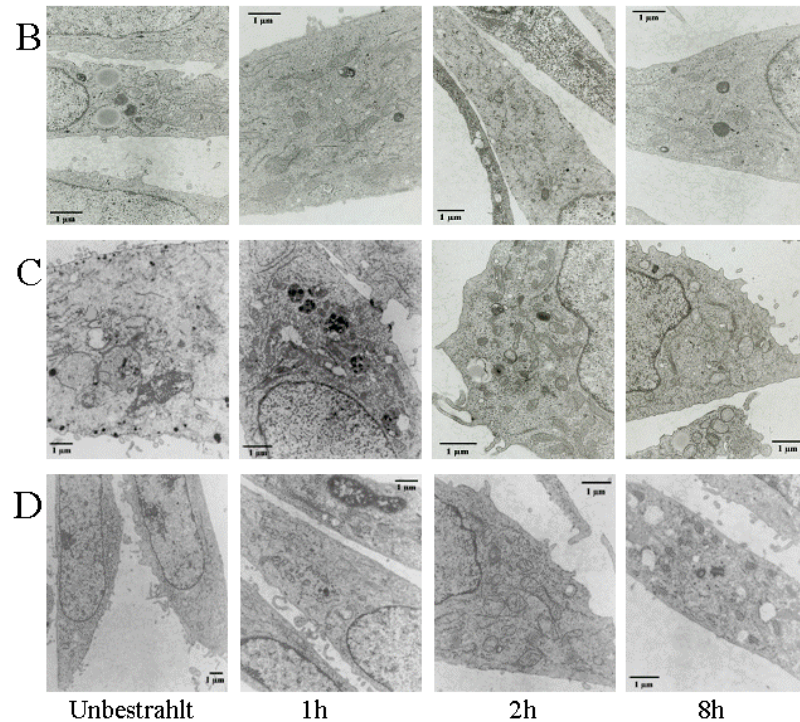


Abbildung 27B-D: Zeitliche Induktion autophagischer Vesikel nach Bestrahlung.

Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und nach 1, 2 und 8 Stunden fixiert. (B) A549, (C) HTB43, (D) HTB35.

3.2.8 Induktion der Vesikelbildung nach verschiedenen Bestrahlungsdosen (TEM)

Auf RNA-Ebene wurde bereits nach einer geeigneten Bestrahlungsdosis für Experimente gesucht. Es sollte eine Dosis gefunden werden, bei der nicht nur die Aktivierung der RNA-Expression, sondern tatsächlich auch die Bildung autophagischer Vesikel induziert wird. Dazu wurden MDA-MB-231 mit 1, 2 und 4 Gy bestrahlt und die Vesikelinduktion beobachtet (s. Abbildung 28). Bei einer Bestrahlungsdosis von 1 Gy war die Bildung autophagischer Vesikel etwas reduzierter als bei höheren Dosen. Zwischen 2 und 4 Gy ließ sich jedoch kein Unterschied in der Induktion feststellen, so dass für weitere Versuche die therapeutische Dosis von 2 Gy gewählt wurde.

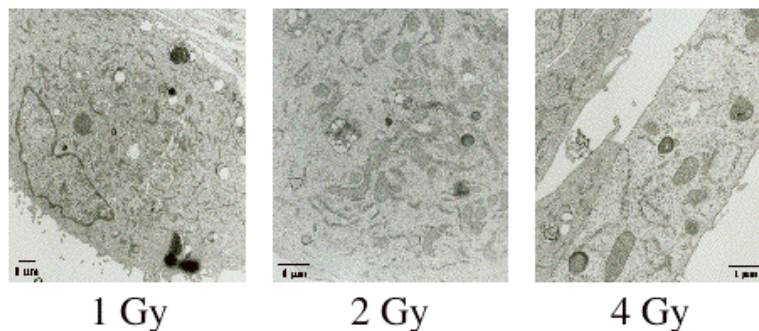


Abbildung 28: Bildung autophagischer Vesikel nach Bestrahlung (1, 2 und 4 Gy) in MDA-MB-231.

3.2.9 Positivkontrollen im Elektronenmikroskop (Vinblastinsulfat, Rapamycin)

Zellen zeigen im elektronenmikroskopischen Bild zahlreiche Arten intrazellulärer Kompartimente und Vesikel. Um autophagische Vesikel zu erkennen, konnte zum einen das Kriterium der Doppelmembran angewandt werden. Zum anderen sollte eine chemische Positivkontrolle das Aussehen der Autophagosomen bestätigen. So ließe sich festlegen, ob es sich bei den durch Bestrahlung induzierten Vesikeln um Autophagosomen handelte. Vinblastinsulfat hemmt die Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen, so dass sich erstere anhäufen. Behandlung von MDA-MB-231 mit 1 mM Vinblastinsulfat für 0,5, 1, 2 oder 3 Stunden zeigte eine deutliche Vesikelinduktion (s. Abbildung 29).

In Ratten-Hepatocyten haben Vinblastinsulfat-induzierte autophagische Vakuolen das morphologische Aussehen von Autophagosomen. Die in MDA-MB-231-Zellen gebildeten Vesikel wirkten jedoch aufgrund ihrer hellen Färbung „leer“. Da die Zellen keine Schädigung erfahren hatten, verfügten sie somit auch nicht oder kaum über abbaufähiges Material. Allerdings war fraglich, warum die gebildeten Vesikel nur eine einfache Membran anstelle einer Doppelmembran aufwiesen. Viele der Vesikel zeigten zudem kleine schlauchartige Invaginationen. Je nach Zelltyp können die durch Vinblastinsulfat induzierten Vakuolen jedoch lysosomale Enzyme enthalten und daher eher autolysosomalen Charakter haben (Fengsrud *et al.*, 1995). In der hier verwendeten Zelllinie schien Vinblastinsulfat eher die Bildung von Autolysosomen oder Lysosomen zu induzieren, die eine Einzelmembran besitzen. Als Positivkontrolle für die Autophagosomen-Induktion erwies sich Vinblastinsulfat als ungeeignet.

Als weitere Positivkontrolle wurde Rapamycin getestet. Rapamycin bewirkt über die Hemmung der *mTOR*-Kinase die Autophagosomenbildung. MDA-MB-231 wurden mit 22 μ M Rapamycin für 72 Stunden bei 37 °C behandelt und anschließend fixiert. Rapamycin induzierte Autophagie in einer Dosis-abhängigen Art und Weise (Takeuchi *et al.*, 2005). Eindeutig zeigte sich die Induktion von Doppelmembranvesikeln mit zellulärem Inhalt wie auch bei den bestrahlten Zellen aller Zelllinien (Abbildung 27A und Abbildung 27B-D).

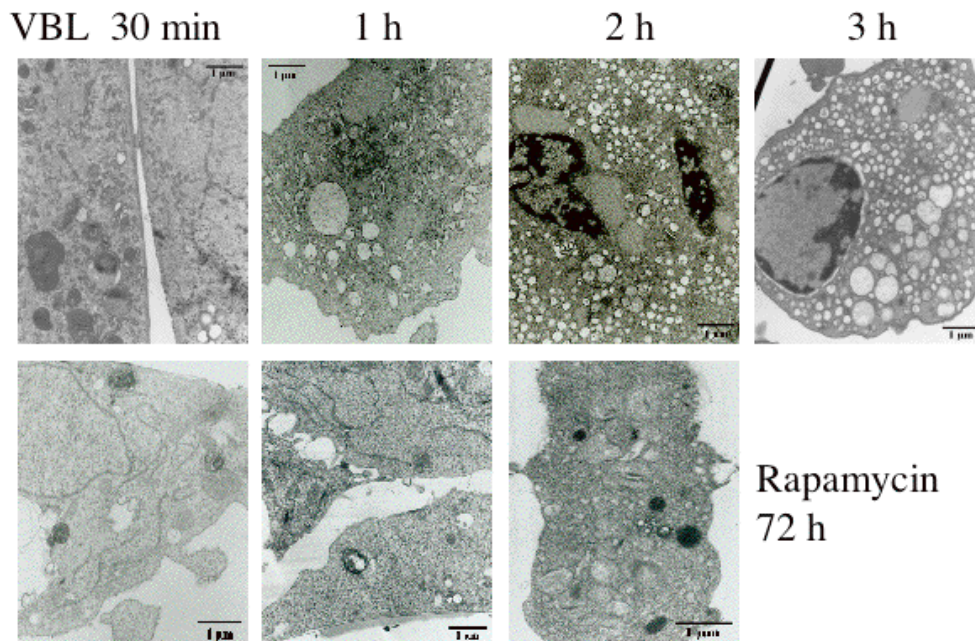


Abbildung 29: Positivkontrollen Vinblastinsulfat (VBL) und Rapamycin.

MDA-MB-231 wurden mit 1 mM Vinblastinsulfat für 30 min, 1 h, 2 h und 3 h (obere Reihe) bzw. mit 22 μ M Rapamycin für 72 Stunden (untere Reihe) induziert.

3.2.10 Hemmung der Autophagie-Induktion durch siRNA in MDA-MB-231 (TEM)

Da durch die siRNAs selektiv mRNAs von Autophagie-Genen abgebaut werden, sollte als Folge der gesamte Autophagie-Prozess beeinträchtigt sein, das heißt, in siRNA transfizierten Zellen sollte die Fähigkeit zur Autophagie-Induktion nach Bestrahlung reduziert sein. In untransfizierten Zellen (nur mit dem Transfektionsreagenz LipofectaminTM behandelt) bzw. siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen dagegen sollte die Vesikelbildung nach Bestrahlung weiterhin möglich sein.

MDA-MB-231 wurden mit LipofectaminTM, siCONTROL non-targeting siRNA und den sechs Target-siRNAs für *BECLIN1*, *APG3*, *APG4B*, *APG4C*, *APG5* und *APG12* transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und 2 Stunden später fixiert. Zum

Vergleich wurde ein Ansatz unbestrahlt fixiert. Den Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten transfizierten Zellen zeigt Abbildung 30. In den Kontrollen (LipofectaminTM und siCONTROL non-targeting siRNA) war im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen eine deutliche Induktion autophagischer Vesikel nach Bestrahlung sichtbar. Diese Induktion konnten Target-siRNA transfizierte Zellen nicht mehr leisten. Die Hemmung der Autophagie-Gene auf RNA-Ebene verhinderte die Autophagosomenbildung nach Bestrahlung. Es war kein Unterschied mehr zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen sichtbar.

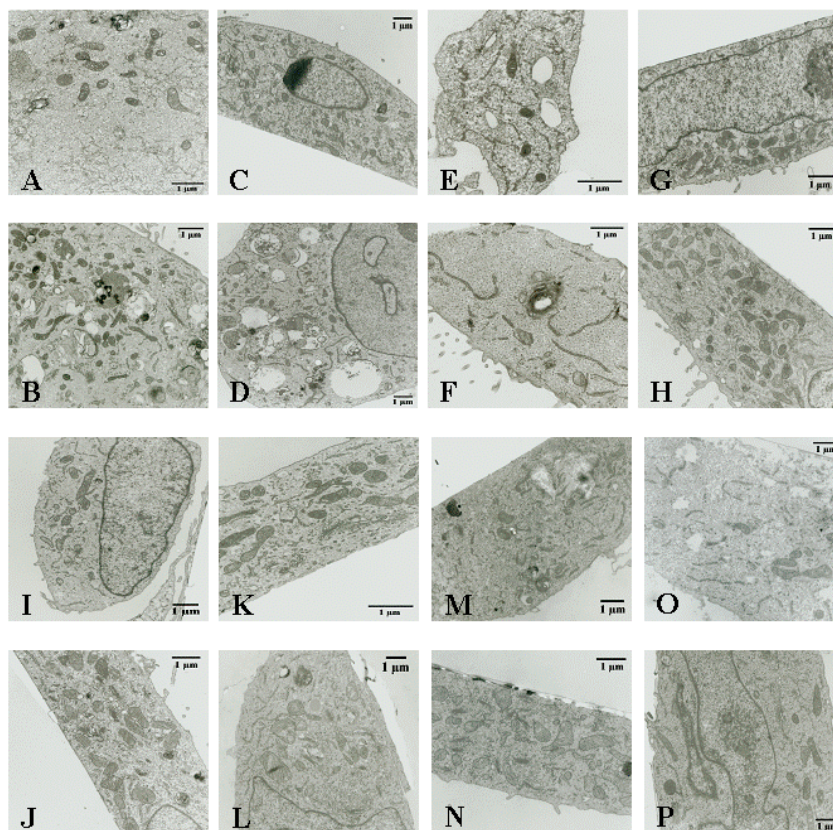


Abbildung 30: Induktion autophagischer Vesikel in siRNA-transfizierten MDA-MB-231 nach Bestrahlung.

48 Stunden nach der Transfektion wurden MDA-MB-231 mit 2 Gy bestrahlt und 2 Stunden später fixiert. A: LipofectaminTM, 0 Gy; B: LipofectaminTM, 2 Gy; C: siCONTROL non-targeting siRNA, 0 Gy; D: siCONTROL non-targeting siRNA, 2 Gy; E: siRNA *BECLIN1*, 0 Gy; F: siRNA *BECLIN1*, 2 Gy; G: siRNA *APG3*, 0 Gy; H: siRNA *APG3*, 2 Gy; I: siRNA *APG4B*, 0 Gy; J: siRNA *APG4B*, 2 Gy; K: siRNA *APG4C*, 0 Gy; L: siRNA *APG4C*, 2 Gy; M: siRNA *APG5*, 0 Gy; N: siRNA *APG5*, 2 Gy; O: siRNA *APG12*, 0 Gy; P: siRNA *APG12*, 2 Gy.

3.2.11 Hemmung der Autophagie-Induktion durch siRNA in HTB43 (TEM)

Da die Zelllinie HTB43 im Koloniebildungstest eine große Strahlensensitivität zeigte, sollte auch in dieser Zelllinie die Fähigkeit zur Autophagosomenbildung nach Transfektion mit und ohne Bestrahlung elektronenmikroskopisch analysiert werden. Auch hier wurden untransfizierte (Lipofectamin™) und siCONTROL non-targeting siRNA transfizierte Zellen mit Target-siRNA transfizierten Zellen verglichen. Dazu wurden HTB43 mit Lipofectamin™, siCONTROL non-targeting siRNA und den siRNAs für *BECLIN1*, *APG3*, *APG4B*, *APG4C*, *APG5* und *APG12* transfiziert, 2 Tage später mit 2 Gy bestrahlt und fixiert. Zum Vergleich wurde zur selben Zeit ein Ansatz unbestrahlt fixiert (s. Abbildung 31). Leider eignete sich diese Zelllinie nur schwer zur Mikroskopie, da auch bei äußerst sorgfältiger Behandlung während der Fixierung große Zellverluste auftraten. Die Probenpräparation erwies sich als schwierig und zur Mikroskopie verblieben meist nur sehr wenige Zellen.

Eine klare Bestrahlungsreaktion war bei dieser Zelllinie weder in den Kontrollen noch in den Target-siRNA transfizierten Zellen zu beobachten. Leider war die Lipofectamin™-Kontrolle trotz mehrfacher Wiederholung nach der Probenpräparation nicht zur Mikroskopie geeignet, so dass allein die siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen als Kontrolle blieben. In den siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen war eine leichte Induktion autophagischer Vesikel nach Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen zu erahnen, bei den Target-siRNA transfizierten Zellen war kein Unterschied zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen zu sehen.

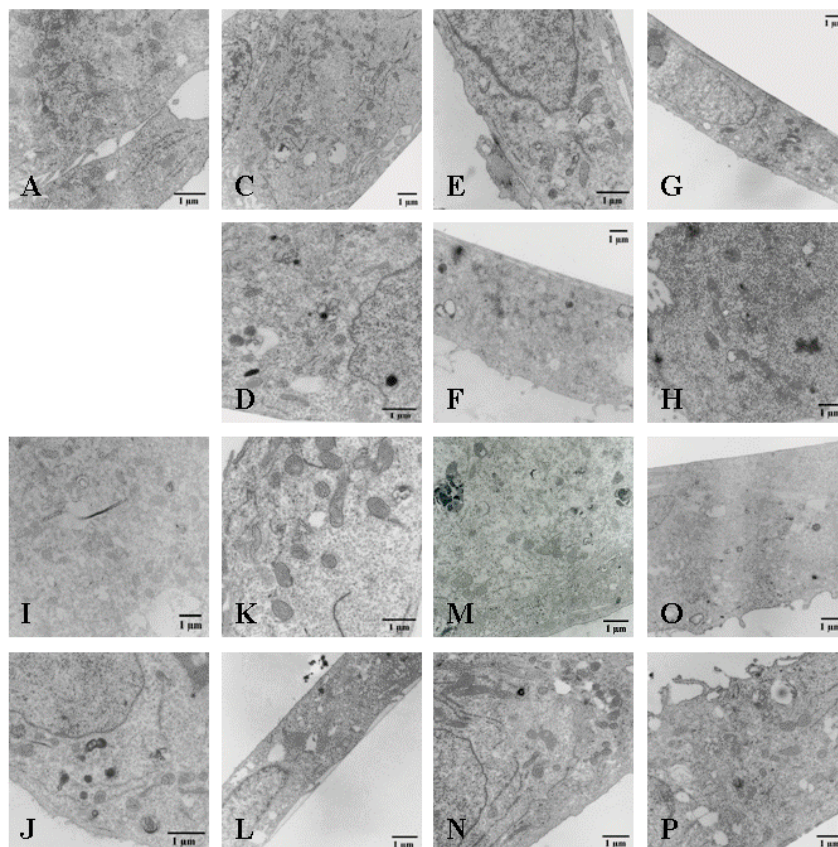


Abbildung 31: Induktion autophagischer Vesikel in siRNA-transfizierten HTB43 nach Bestrahlung.

48 Stunden nach der Transfektion wurden HTB43 mit 2 Gy bestrahlt und 2 Stunden später fixiert. A: Lipofectamin™, 0 Gy; C: siCONTROL non-targeting siRNA, 0 Gy; D: siCONTROL non-targeting, 2 Gy; E: siRNA *BECLIN1*, 0 Gy; F: siRNA *BECLIN1*, 2 Gy; G: siRNA *APG3*, 0 Gy; H: siRNA *APG3*, 2 Gy; I: siRNA *APG4B*, 0 Gy; J: siRNA *APG4B*, 2 Gy; K: siRNA *APG4C*, 0 Gy; L: siRNA *APG4C*, 2 Gy; M: siRNA *APG5*, 0 Gy; N: siRNA *APG5*, 2 Gy; O: siRNA *APG12*, 0 Gy; P: siRNA *APG12*, 2 Gy.

3.2.12 Vesikelbildung in den verschiedenen Zelllinien (FM)

Die Induktion autophagischer Vesikel kann nicht nur elektronenmikroskopisch sondern auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Das cytosolische Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (kurz LC3-Ip) wird während der Bildung der prä-autophagosomalen Membran durch die Enzyme Apg3p und Apg7p in seine Membran-assoziierte Form (LC3-IIp) überführt. Das LC3-II-Protein wird selektiv in Autophagosomen eingebaut und verbleibt auch nach deren Fertigstellung in der Membran. Durch die Fusion des LC3p-Proteins mit einem GFP-Protein wurde ein Markerprotein speziell für Autophagosomen kreiert. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Tamotsu Yoshimori (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan) zur Verfügung gestellt (Kabeya *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie, bei der allein die Bildung autophagischer Vesikel nachgewiesen werden kann, sollte bei der Fluoreszenzmikroskopie auch deren Funktionalität getestet werden. Zwar ist ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis wesentlich weniger sensitiv als ein elektronenmikroskopischer, aber er leistet eine relativ einfache und schnelle Quantifizierung der Ergebnisse.

In allen vier Zelllinien wurde die Vesikelinduktion nach Bestrahlung fluoreszenzmikroskopisch getestet. Dazu wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid nach demselben Transfektionsprotokoll mit LipofectaminTM transfiziert und 2 Tage nach der Transfektion mit 2 Gy bestrahlt. 2 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend mikroskopiert. Wie Abbildung 32 zeigt, war in allen vier Zelllinien eine relativ hohe Fluoreszenzverteilung beobachtbar. Die unspezifischen Punkte resultierten entweder aus einem hohen Basislevel an Autophagie oder sie repräsentierten die ungebundene cytosolische Form des GFP-LC3-Proteins (LC3-Ip). Auch in unbestrahlten Zellen war dieser Hintergrund zu sehen. MDA-MB-231 (Abbildung 32A) eigneten sich sehr gut zur Mikroskopie, da die Zellen groß und die Vesikel gut unterscheidbar waren. In Abbildung 32B-D wurde derselbe Versuch mit A549, HTB43 und HTB35 durchgeführt, bei denen in dieser Reihenfolge die Zellgröße abnahm. HTB43 zeigten zusätzlich die Schwierigkeit, dass die Zellen nur eine geringe Adhärenz aufwiesen und selbst bei vorsichtiger Fixierung nur wenige Zellen zur Mikroskopie übrig blieben. HTB35 waren ungeeignet für Fluoreszenzmikroskopie, da die gesamte Zelle und somit auch der gesamte Intrazellularraum selbst für ein hohes Objektiv (63 oder 100) zu klein waren. In allen weiteren Versuchen wurde daher hauptsächlich mit MDA-MB-231 gearbeitet.

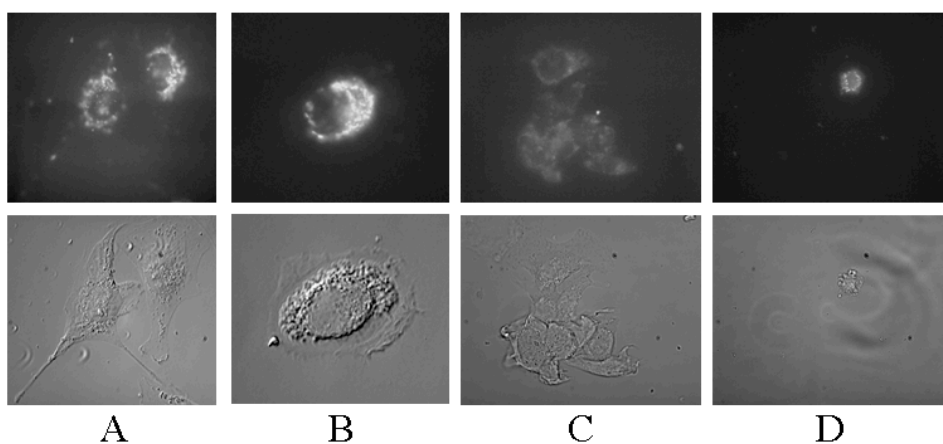


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Vesikelinduktion nach Bestrahlung.

MDA-MB-231(A), A549 (B), HTB43 (C) und HTB35 (D) wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid transfiziert, 2 Tage später mit 2 Gy bestrahlt und nach 2 Stunden fixiert.

3.2.13 Positivkontrollen im Fluoreszenzmikroskop (Vinblastinsulfat, Rapamycin)

Um zu beurteilen, ob Bestrahlung eine Vesikelinduktion auslöst, muss das Ausmaß dieser Induktion durch eine Positivkontrolle aufgezeigt werden. Die Induktion könnte in einer gesteigerten Vesikelanzahl, -größe oder -intensität resultieren.

Die Behandlung von MDA-MB-231 mit 1 mM Vinblastinsulfat für 1 oder 2 Stunden zeigte keine nennenswerte Änderung verglichen zur basalen Hintergrundfluoreszenz der unbehandelten Kontrolle (s. Abbildung 33B, C). Vinblastinsulfat war auch bei der Elektronenmikroskopie entgegen der Literatur (Munafo & Colombo, 2001) keine vertrauenswürdige Kontrolle. Eine Inkubation von MDA-MB-231 mit 22 μM Rapamycin für 48 oder 72 Stunden bei 37 °C jedoch zeigte eine deutliche Steigerung der Vesikelgröße und damit verbunden auch der Intensität (s. Abbildung 33D, E) gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

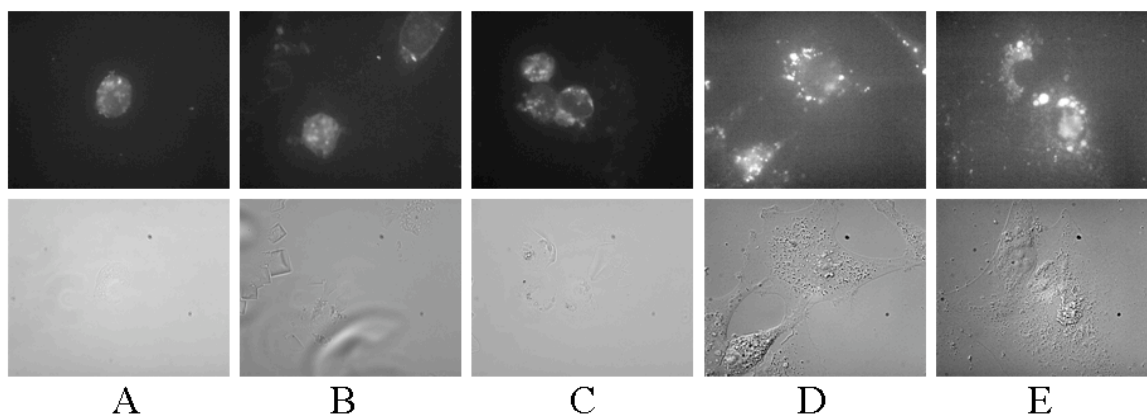


Abbildung 33: Positivkontrollen Vinblastinsulfat und Rapamycin.

MDA-MB-231 wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid transfiziert (A), 2 Tage später mit 1 mM Vinblastinsulfat für 1 und 2 h (B, C), bzw. 6 Stunden nach der Transfektion mit 22 μM Rapamycin für 48 und 72 h (D, E) induziert.

3.2.14 Induktion der Vesikelbildung nach verschiedenen Bestrahlungsdosen (FM)

Auf verschiedenen Ebenen wurde bereits nach einer für das jeweilige Experiment geeigneten Bestrahlungsdosis gesucht. Auf RNA-Ebene, für Elektronenmikroskopie und den klonogenen Überlebenstest erwies sich eine Einzelbestrahlung mit 2 Gy als brauchbar. Um mittels Fluo-

reszenzmikroskopie den Einfluss von Bestrahlung auf Zellen zu testen, musste die Dosis deutlich erhöht werden. Plasmid-transfizierte MDA-MB-231 wurden mit 2, 4 und 10 Gy bestrahlt und nach jeweils 2 bzw. 4 Stunden fixiert. Abbildung 34 zeigt, dass erst eine Bestrahlungsdosis von 10 Gy überhaupt Unterschiede in der Vesikelgröße induzierte. Bei den weiteren Versuchen wurde mit 10 Gy-Einzelbestrahlungsdosis gearbeitet, allerdings musste der Zeitintervall bis zur Fixierung noch geprüft werden.

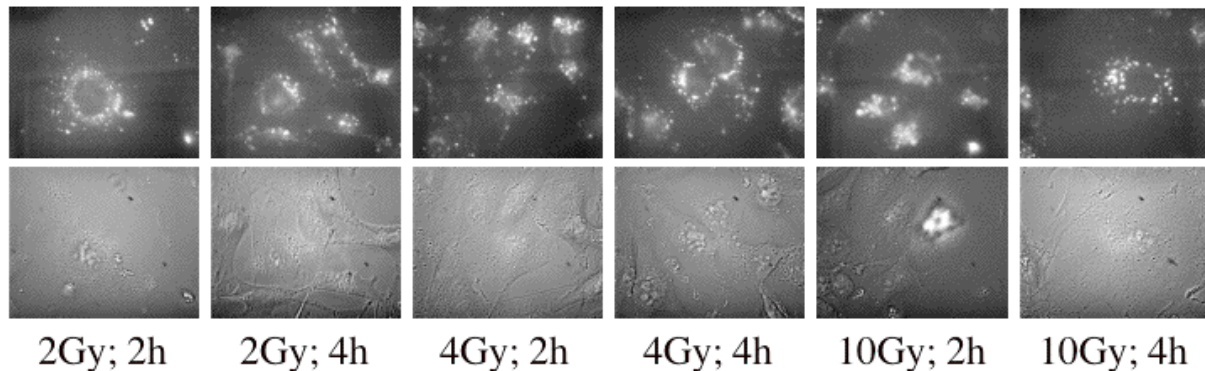


Abbildung 34: Bildung autophagischer Vesikel bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis.

MDA-MB-231 wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid transfiziert und nach 2 Tagen mit 2, 4 und 10 Gy bestrahlt. Die Fixierung erfolgte jeweils nach 2 bzw. 4 Stunden nach der Bestrahlung.

3.2.15 Zeitliche Induktion der Vesikelbildung nach Bestrahlung (FM)

Nach der Dosis musste noch der Zeitpunkt zur Fixierung bestimmt werden. Die Zellen brauchen nach der Bestrahlung eine gewisse Zeit zur Ausbildung autophagischer Vesikel, in denen das beschädigte Zellmaterial abgebaut werden soll. Die beteiligten Gene werden sehr schnell induziert, jedoch bis zur Ausbildung kompletter Autophagosomen vergeht einige Zeit. Da 10 Gy eine für Zellen letale Dosis bedeuten kann, darf jedoch dieser Zeitintervall nicht zu groß sein, ansonsten würde man eher Apoptose beobachten oder die Zellen wären bereits vor der Mikroskopie abgestorben. Um den wirkungsvollsten Zeitpunkt abzugewinnen, wurden Plasmid-transfizierte MDA-MB-231 mit einer Einzeldosis von 10 Gy bestrahlt und nach 2, 4, 6 und 8 Stunden fixiert. 2 Stunden nach der Bestrahlung waren bereits Vesikel von der Hintergrundfärbung unterscheidbar, die mit 4 und 6 Stunden Fixierungsverzögerung deutlich größer wurden (s. Abbildung 35). Da die Zellen 8 Stunden nach Bestrahlung bereits sehr gestresst aussahen, wurde als geeigneter Zeitpunkt zur Fixierung 6 Stunden nach Bestrahlung gewählt.

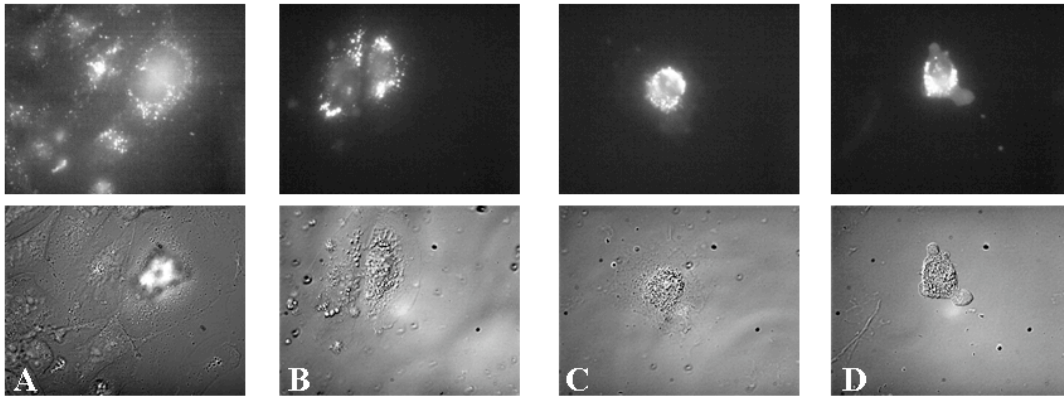


Abbildung 35: Zeitliche Induktion der Autophagosomenbildung nach Bestrahlung.

MDA-MB-231 wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid transfiziert, 2 Tage später mit 10 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten fixiert; (A) 2 h nach Bestrahlung, (B) 4 h nach Bestrahlung, (C) 6 h nach Bestrahlung, (D) 8 h nach Bestrahlung.

3.2.16 Co-Transfektion von *GFP-LC3* und *siGLO RISC-free siRNA* (FM)

Um die Reaktion siRNA-transfizierter Zellen auf Bestrahlung zu untersuchen, musste zunächst sichergestellt sein, dass bei der Co-Transfektion sowohl die siRNA als auch das *GFP-LC3*-Plasmid in die Zelle aufgenommen werden. Dies konnte mit einer Rot-fluoreszierenden Kontroll-siRNA (*siGLO RISC-Free siRNA*) getestet werden. MDA-MB-231 wurden mit dieser siRNA und dem *GFP-LC3*-Plasmid co-transfiziert. 2 Tage später wurden die Zellen mit unterschiedlichen Filtern mikroskopiert. Der GFP-Filter für das Plasmid besaß eine Absorption von 488 nm und eine Emission von 512 nm, der Rhodamin-Filter für die siRNA hatte eine Anregung von 550 nm und eine Emission 570 nm. Wie Abbildung 36 zeigt, erfolgte sowohl die Aufnahme des *GFP-LC3*-Plasmids als auch die der Kontroll-siRNA in gleichem Umfang. Vor allem im oberen Bild wurde die cytoplasmatische Verteilung beider Produkte um den Kern herum deutlich sichtbar. Das untere Bild lässt erkennen, dass die Anreicherung von siRNA und *GFP-LC3*-Plasmid zwar ähnlich, aber nicht identisch war.

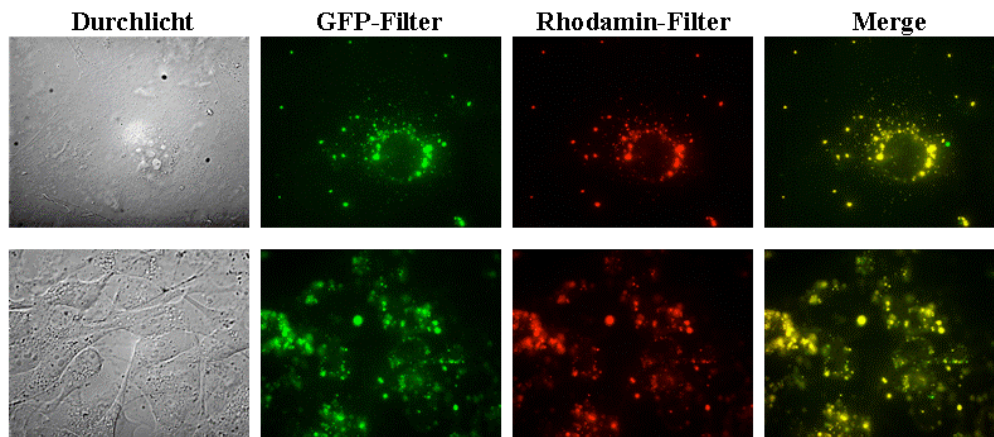


Abbildung 36: Co-Transfektion von *GFP-LC3*-Plasmid und einer Fluoreszenzmarkierten Control-siRNA.

MDA-MB-231 wurden gleichzeitig mit 1 $\mu\text{g/ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid und 50 pmol/well si*GLO* RISC-free siRNA co-transfiziert und 2 Tage später fixiert.

3.2.17 Hemmung der Autophagie-Induktion durch siRNA in MDA-MB-231 (FM)

Dem durch Bestrahlung eingeleiteten Autophagie-Prozess sollte durch Transfektion mit siRNAs entgegengewirkt werden. In Target-siRNA transfizierten Zellen sollte die Fähigkeit zur Autophagie nach Bestrahlung reduziert sein, es sollten neben dem Grundlevel kaum neue Autophagosomen gebildet werden können. Untransfizierte (LipofectaminTM-behandelte) und si*CONTROL* non-targeting siRNA transfizierte Zellen dagegen sollten weiterhin zur Vesikelbildung nach Bestrahlung fähig sein.

MDA-MB-231 wurden mit LipofectaminTM, si*CONTROL* non-targeting siRNA und den sechs Target-siRNAs für *BECLIN1*, *APG3*, *APG4B*, *APG4C*, *APG5* und *APG12* zusammen mit dem *GFP-LC3*-Plasmid co-transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt und 6 Stunden später fixiert. Zum Vergleich wurde ein Ansatz unbestrahlt fixiert. Den Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten transfizierten Zellen zeigt Abbildung 37. In den Kontrollen (LipofectaminTM und si*CONTROL* non-targeting siRNA) war im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen die Induktion einiger großer autophagischer Vesikel nach Bestrahlung sichtbar (s. Abbildung 37B, D). Diese Induktion war bei Target-siRNA transfizierten Zellen vermindert (s. Abbildung 37E-P). Die Hemmung der Autophagie-Gene auf RNA-Ebene verhinderte die Autophagosomenbildung nach Bestrahlung. Es war kein Unterschied mehr zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen sichtbar.

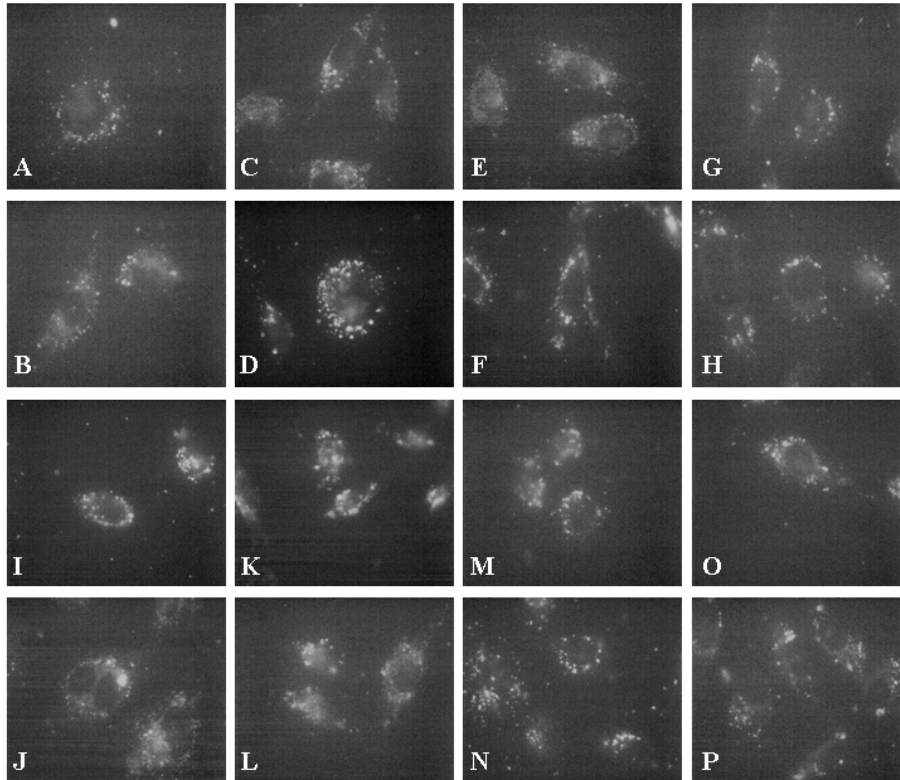


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Vesikelinduktion in siRNA-transfizierten MDA-MB-231 nach Bestrahlung.

MDA-MB-231 wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ *GFP-LC3*-Plasmid und 50 pmol/well siRNA co-transfiziert, 48 Stunden nach der Transfektion mit 10 Gy bestrahlt und 6 Stunden später fixiert. A: LipofectaminTM, 0 Gy; B: LipofectaminTM, 10 Gy; C: siCONTROL non-targeting siRNA, 0 Gy; D: siCONTROL non-targeting siRNA, 10 Gy; E: siRNA *BECLINI*, 0 Gy; F: siRNA *BECLINI*, 10 Gy; G: siRNA *APG3*, 0 Gy; H: siRNA *APG3*, 10 Gy; I: siRNA *APG4B*, 0 Gy; J: siRNA *APG4B*, 10 Gy; K: siRNA *APG4C*, 0 Gy; L: siRNA *APG4C*, 10 Gy; M: siRNA *APG5*, 0 Gy; N: siRNA *APG5*, 10 Gy; O: siRNA *APG12*, 0 Gy; P: siRNA *APG12*, 10 Gy.

Da die Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen zwar deutlich, aber nicht allzu zahlreich waren, wurde die Vesikelbildung zusätzlich in drei unabhängigen Versuchen mikroskopisch quantifiziert. Dazu wurden pro Behandlung bei 50 Zellen autophagische Vesikel ausgezählt. Die Kriterien für autophagische Vesikel waren Größe und eine augenscheinlich hellere Fluoreszenz. Die Anzahl der Vesikel nahm nach Bestrahlung in den Kontrollzellen bis um das 18-fache (A549 wt. *P53* und A549 mut. *P53*) bzw. 28-fache (MDA-MB-231) zu verglichen zu den Target-siRNA transfizierten Zellen (s. Tabelle 15-Tabelle 17). Eine Signifikanzanalyse ergab, dass sich die Target-siRNA transfizierten Zellen signifikant von siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen in der Fähigkeit zur Vesikelinduktion

unterschieden. Neben den qualitativen Ergebnissen der Elektronenmikroskopie konnte somit nun auch quantitativ durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden, dass die Hemmung autophagischer Gene mittels siRNA die Autophagie nach Bestrahlung deutlich beeinträchtigte.

Tabelle 15: Fluoreszenzmikroskopische Quantifikation der Vesikelinduktion nach Bestrahlung in MDA-MB-231.

MDA-MB-231 wurden mit 1 µg/ml *GFP-LC3*-Plasmid und 50 pmol/well siRNA co-transfiziert, 48 Stunden nach der Transfektion mit 10 Gy bestrahlt und 6 Stunden später fixiert. Pro Bedingung wurden 50 Zellen ausgewertet und die autophagischen Vesikel pro Zelle gezählt. Für die Statistik wurde jeder Versuch 3-mal wiederholt. Die Signifikanzanalyse der Vesikelbildung bestrahlter, Target-siRNA transfizierter Zellen im Vergleich zu siCONTROL non-targeting siRNA transfizierter Zellen ist mit * ($p < 0,05$) bzw. ** ($p < 0,01$) angegeben.

siRNA	Autophagische Vesikel	
	0 Gy	10 Gy
Lipofectamin™	0,09 ± 0,14	1,65 ± 1,33
CONTROL	0,07	2,02 ± 1,72
BECLIN1	0,05	0,33 ± 0,79**
APG3	0,02	0,15 ± 0,30**
APG4B	0,02	0,13 ± 0,35*
APG4C	0,02	0,16 ± 0,46**
APG5	0,03	0,15 ± 0,41**
APG12	0,02	0,10**

Tabelle 16: Fluoreszenzmikroskopische Quantifikation der Vesikelinduktion nach Bestrahlung in A549 wt. P53.

A549 mit Wildtyp-*P53* wurden mit 1 µg/ml *GFP-LC3*-Plasmid und 50 pmol/well siRNA co-transfiziert, 48 Stunden nach der Transfektion mit 10 Gy bestrahlt und 6 Stunden später fixiert. Pro Bedingung wurden 50 Zellen ausgewertet und die autophagischen Vesikel pro Zelle gezählt. Für die Statistik wurde jeder Versuch 3-mal wiederholt. Die Signifikanzanalyse der Vesikelbildung bestrahlter, Target-siRNA transfizierter Zellen im Vergleich zu siCONTROL non-targeting siRNA transfizierter Zellen ist mit * ($p < 0,05$) angegeben.

siRNA	Autophagische Vesikel	
	0 Gy	10 Gy
Lipofectamin TM	0,09 ± 0,19	2,57 ± 1,30
<i>CONTROL</i>	0,13 ± 0,50	2,28 ± 1,07
<i>BECLINI</i>	0,06	0,47 ± 0,26
<i>APG3</i>	0,05	0,07 ± 0,39*
<i>APG4B</i>	0,06	0,07 ± 0,19*
<i>APG4C</i>	0,03	0,09 ± 0,15*
<i>APG5</i>	0,06 ± 0,19	0,05*
<i>APG12</i>	0,07	0,14*

Tabelle 17: Fluoreszenzmikroskopische Quantifikation der Vesikelinduktion nach Bestrahlung in A549 mut. P53.

A549 mit überexprimiertem mutiertem *P53* wurden mit 1 µg/ml *GFP-LC3*-Plasmid und 50 pmol/well siRNA co-transfiziert, 48 Stunden nach der Transfektion mit 10 Gy bestrahlt und 6 Stunden später fixiert. Pro Bedingung wurden 50 Zellen ausgewertet und die autophagischen Vesikel pro Zelle gezählt. Für die Statistik wurde jeder Versuch 3-mal wiederholt. Die Signifikanzanalyse der Vesikelbildung bestrahlter, Target-siRNA transfizierter Zellen im Vergleich zu si*CONTROL* non-targeting siRNA transfizierter Zellen ist mit ** (p<0,01) angegeben.

siRNA	Große Vesikel	
	0 Gy	10 Gy
Lipofectamin TM	0,12 ± 0,56	1,89 ± 1,06
<i>CONTROL</i>	0,11 ± 0,55	1,99 ± 1,03
<i>BECLINI</i>	0,04	0,17 ± 0,52**
<i>APG3</i>	0,07 ± 0,62	0,09 ± 0,18**
<i>APG4B</i>	0,05 ± 0,24	0,13 ± 0,57**
<i>APG4C</i>	0,05 ± 0,19	0,09 ± 0,39**
<i>APG5</i>	0,05 ± 0,19	0,07 ± 0,19**
<i>APG12</i>	0,05 ± 0,24	0,09 ± 0,54**

3.2.18 Koloniebildungstest

Auf RNA-Ebene wurde eine Zeitspanne der RNAi-Wirkung von 5-8 Tagen und auf Proteinebene wurde eine Dauer der RNAi-Wirkung von 6-9 Tagen festgestellt, somit war klar, dass die entscheidende Phase beim Koloniebildungstest abgedeckt war. Anhand der Anzahl gebil-

der Kolonien konnte bei diesem Versuch berechnet werden, wieviele Zellen die Bestrahlung überlebt hatten, d.h. sich weiterhin reproduzieren konnten. Stark geschädigte Zellen starben innerhalb der ersten Tage ab, lösten sich vom Boden und wurden bei den Waschschritten der Fixierung entfernt. Überlebende Zellen, sei es dass sie nicht oder nur schwach geschädigt wurden oder über ein funktionierendes Reparatursystem verfügten, setzten sich ab und bildeten Kolonien. Je schwächer der gesetzte Schaden war, umso mehr und umso größere Kolonien konnten entstehen. Die ausgezählten Kolonien wurden je nach Versuch in einem logarithmischen (Einzeldosis-Bestrahlung) oder linear-quadratischem (fraktionierte Bestrahlung) Modell dargestellt. Da man bei hohen Bestrahlungsdosen meist nur eine geringe Überlebensfraktion erhielt, erlaubte die logarithmische Skalierung der Y-Achse, auch kleine Unterschiede deutlich zu machen.

3.2.19 Zeitpunkt für den Koloniebildungstest nach der Transfektion

In einem ersten Versuch sollte der richtige Zeitpunkt für die Bestrahlung und die Aussaat des Koloniebildungstests gefunden werden. Dazu wurden Zellen transfiziert, nach verschiedenen Zeiten mit 2 Gy bestrahlt und für den Koloniebildungstest mit je 300 Zellen/well ausgesät. Die Überlebensfraktion des 1. Tages wurde als 1 gesetzt, auf die die Überlebensfraktionen der folgenden Tage bezogen wurden. Wie Abbildung 38 anhand der unbestrahlten Kontrolle zeigt, stellte die Transfektion an sich für die Zellen einen zellulären Stress dar. Bestrahlung und Koloniebildungstest so kurz nach der Transfektion senkten das Zell-Überleben. 2 Tage nach der Transfektion schienen sich die Zellen von diesem Stress erholt zu haben, denn die Überlebensfraktion stieg an. Der Koloniebildungstest sollte nicht die Transfektionsprozedur, sondern allein die Reaktion der Zellen auf Bestrahlung widerspiegeln. Die Versuche 2-6 Tage nach der Transfektion unterschieden sich kaum, allerdings war bei einer um 6 Tage verzögerten Aussaat damit zu rechnen, dass der RNAi-Effekt bereits ausklang. Für alle weiteren Versuche wurde daher der Zeitpunkt 2 Tage nach der Transfektion für Bestrahlung und Koloniebildungstest gewählt.

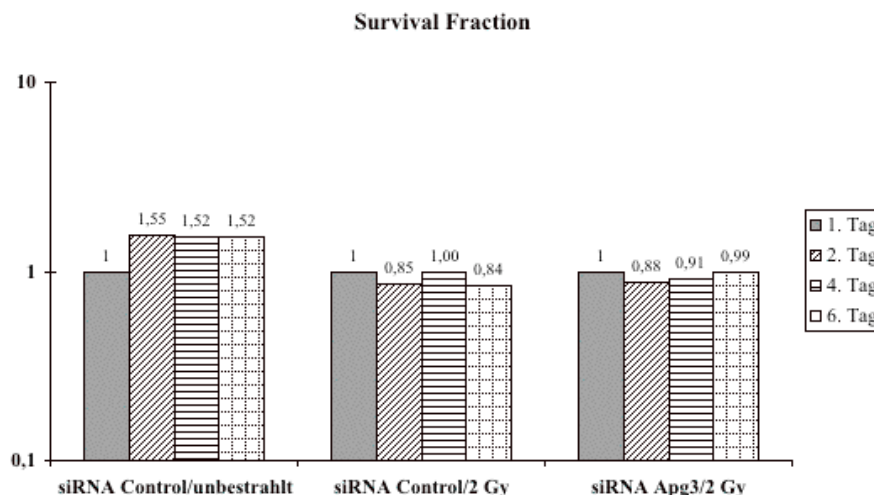


Abbildung 38: Koloniebildungstest zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion.

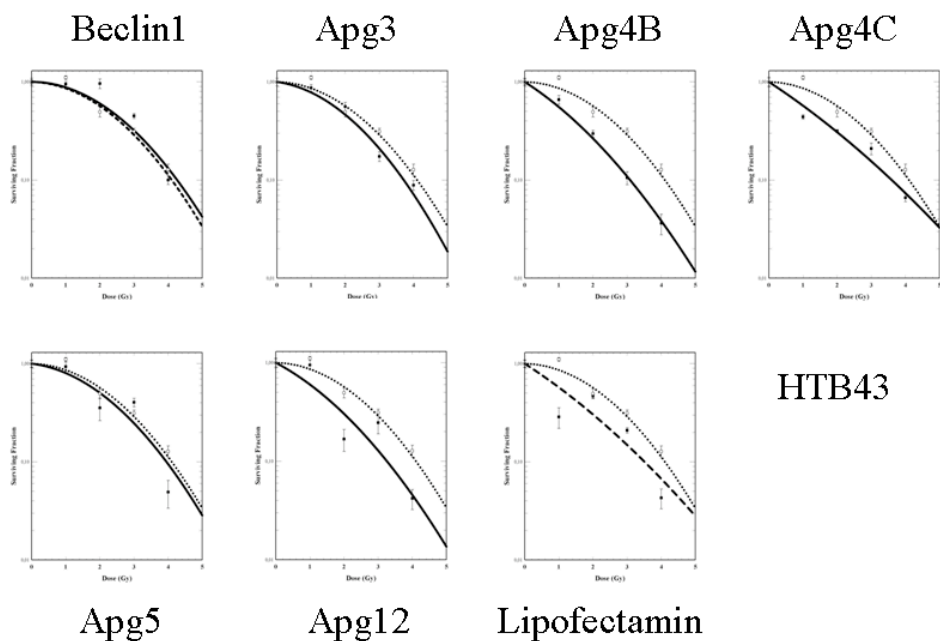
A549 wurden transfiziert. 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und sofort für Koloniebildungstest (je 300 Zellen/well) ausgesät. Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Kolonien ausgezählt.

3.2.20 Dosis-Wirkungskurven mit Einzeldosis-Bestrahlung

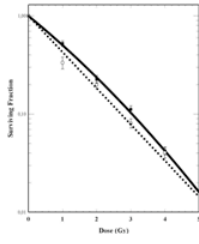
Wenn durch Bestrahlung Autophagie induziert wird, um geschädigte Zellbestandteile abzubauen, sollte diese Reaktion im klonogenen Überlebenstest erkennbar sein. Die Inhibition der Autophagie-Gene durch siRNA sollte demnach zu einer Radiosensitivierung der Zellen führen, denn die Anhäufung schadhafter Strukturen und Organellen führt zur Aktivierung des programmierten Zelltods.

Die Strahlenreaktion der Target-siRNA transfizierten Zellen wurde mittels Dosis-Wirkungskurven bei Einzeldosen von (1, 2, 3 und 4 Gy) im Vergleich zu siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen bestimmt. Wie Abbildung 39 zeigt, bewirkten die verschiedenen siRNAs ein unterschiedliches Ausmaß an Radiosensitivierung. Die Zelllinien schienen generell unterschiedlich auf Bestrahlung anzusprechen. So zeigte die Zelllinie HTB43 bei allen Target-siRNAs die deutlichsten Effekte. In der Zelllinie HTB35 konnten meist leichte Reaktionen, bei MDA-MB-231 und A549 nur eine geringe Wirkung beobachtet werden. *BECLIN1*-siRNA hatte entweder keine (HTB43 und HTB35) oder aber eine eher radioprotektive Wirkung (MDA-MB-231 und A549) verglichen zur siCONTROL non-targeting siRNA. *APG3*-siRNA zeigte nur bei HTB43 eine schwache Strahlensensitivierung, jedoch keinen Effekt bei HTB35, A549 und MDA-MB-231. *APG4B*-siRNA führte bei HTB43 zu einer stark ausgeprägten Sensitivierung und bei HTB35 zu einem schwachen Effekt. Bei

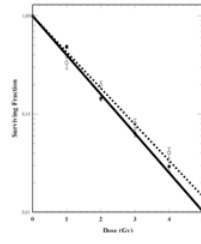
MDA-MB-231 und A549 war keine Wirkung zu erkennen. *APG4C*-siRNA zeigte bei HTB43 und HTB35 keinen Unterschied zur *siCONTROL* non-targeting siRNA, bei MDA-MB-231 und A549 ließ sich eher eine schwache Radioprotektion vermuten. Bei *APG5*-siRNA zeigte keine der Zelllinien eine Strahlenreaktion. *APG12*-siRNA zeigte eine starke Radiosensitivierung bei HTB43 und HTB35, jedoch keine Wirkung bei MDA-MB-231 und A549. Wie aus dem Vergleich zwischen Transfektion mit *siCONTROL* non-targeting siRNA und Transfektion ohne siRNA (nur Lipofectamin™) ersichtlich wird, stellte die Transfektionsprozedur an sich bereits einen mäßigen zellulären Stress dar, der sich auf das Überleben nach Bestrahlung auswirkte.



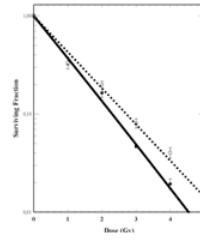
Beclin1



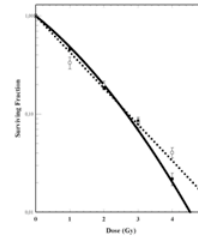
Apg3



Apg4B

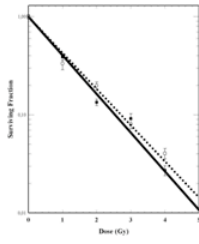


Apg4C

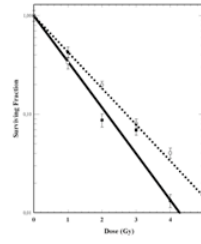


HTB35

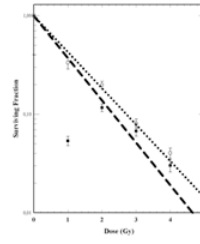
Apg5



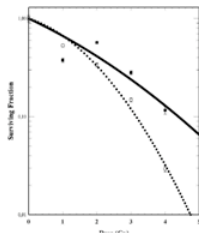
Apg12



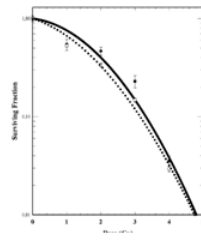
Lipofectamin



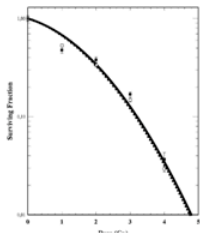
Beclin1



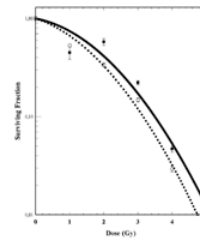
Apg3



Apg4B

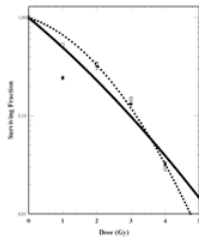


Apg4C

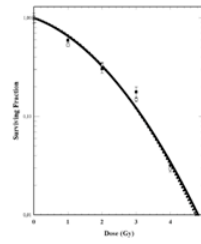


MDA-MB-231

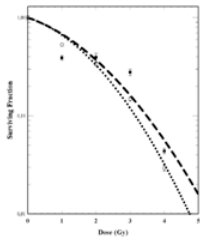
Apg5



Apg12



Lipofectamin



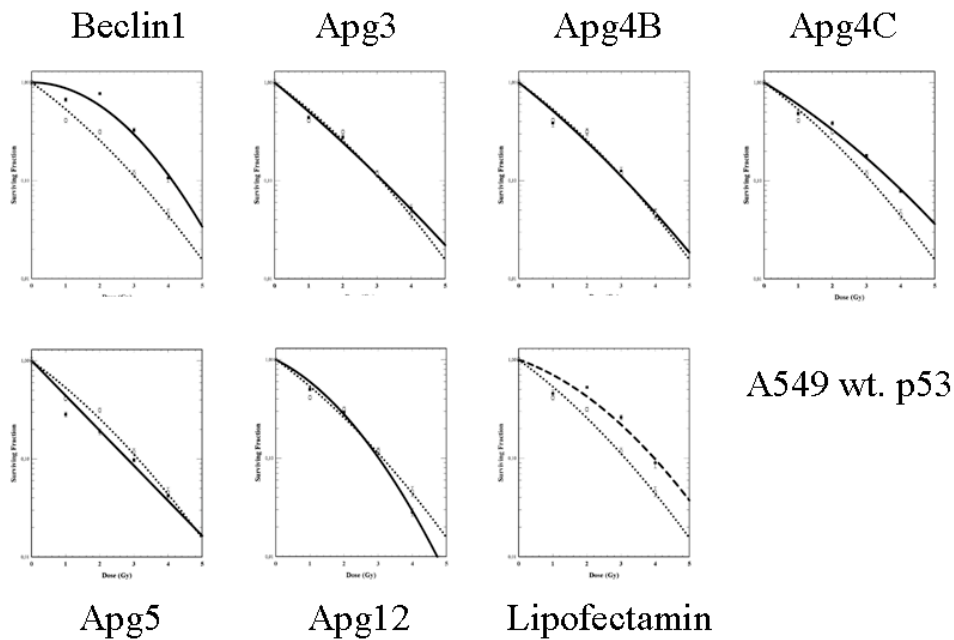


Abbildung 39: Dosis-Wirkungskurve mit Einzeldosis-Bestrahlung im Vergleich zu *siCONTROL* non-targeting siRNA.

Zellen aller vier Zelllinien wurden transfiziert, nach 2 Tagen mit Einzeldosen von 1-4 Gy bestrahlt und sofort für Koloniebildungstest (10 Tage) ausgesät (0 Gy mit 250 Zellen/well, 1 Gy mit 500 Zellen/well, 2 Gy mit 600 Zellen/well, 3 Gy mit 700 Zellen/well, 4 Gy mit 800 Zellen/well). Die Graphen zeigen die gepoolten Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

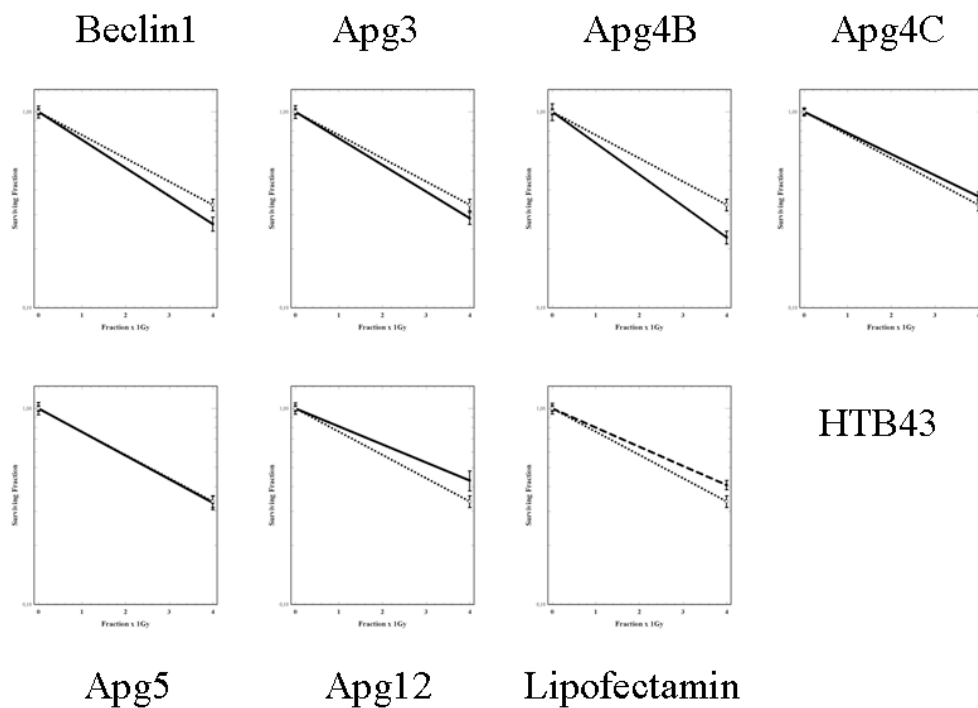
- Transfektion mit Target-siRNA
- Transfektion mit *siCONTROL* non-targeting siRNA
- -■ - - Transfektion ohne siRNA (LipofectaminTM)

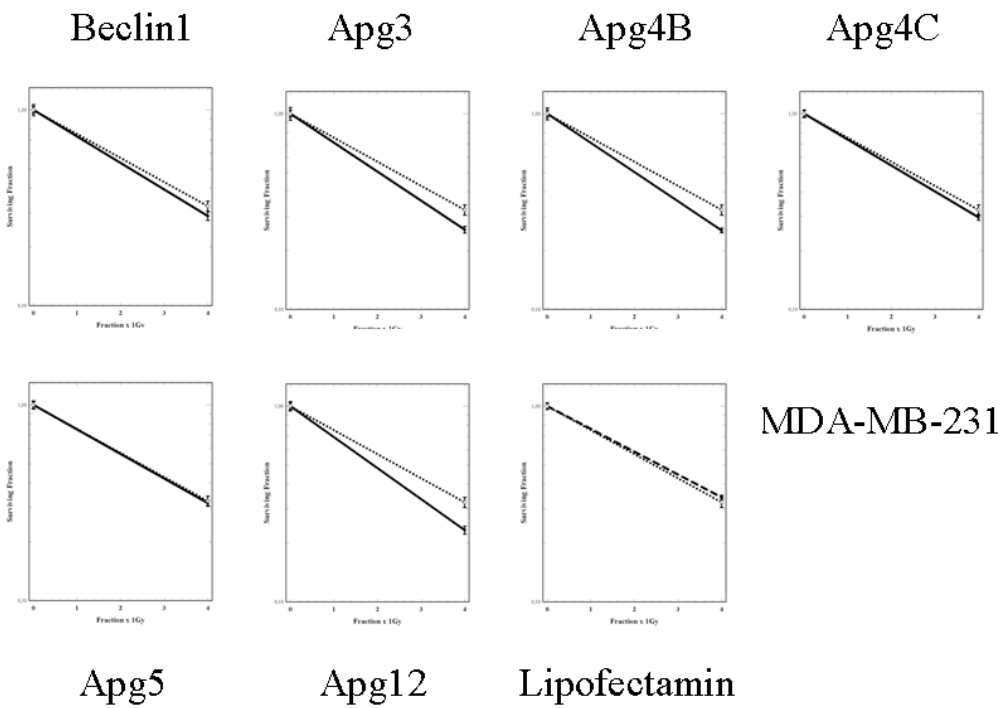
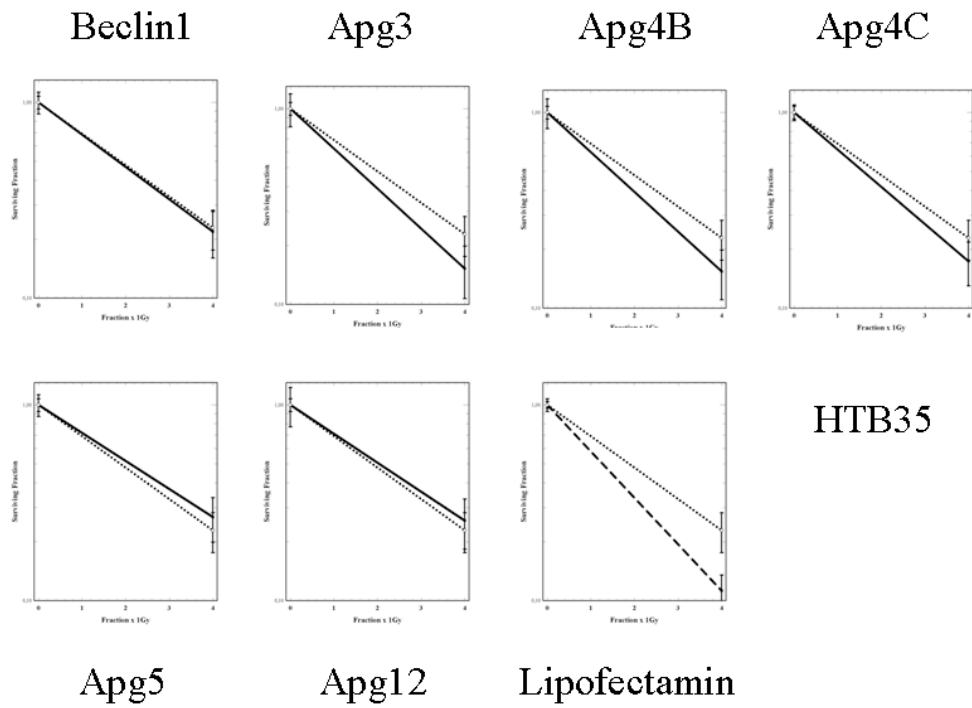
3.2.21 Dosis-Wirkungskurve mit fraktionierter Bestrahlung

Bei der fraktionierten Bestrahlung wird die Strahlendosis nicht auf einmal gegeben, sondern in Teildosen appliziert, so dass es im Verlauf des Versuchs zur gewünschten Dosisaufsättigung kommt. Die Dosis-Wirkungskurve nach fraktionierter Bestrahlung wird linear aufgetragen, da sich die Zellen in den Zeiträumen zwischen den Einzeldosen von einem subletalen Schaden erholen können. Die Analyse mit fraktionierter Bestrahlung hat klinische Relevanz, da dieses Modell in der Tumorthherapie angewandt wird.

Da die Zelllinie A549 bei den Versuchen mit Einzeldosisbestrahlung bei allen Target-siRNAs eine radioprotektive Wirkung zeigte, wurde gefragt, ob die *P53*-Expression einen Einfluss auf die Strahlenreaktion ausübt. Um diesen Einfluss zu prüfen, wurden beim folgenden Versuch auch A549-Zellen mit überexprimiertem mutiertem *P53*-Protein untersucht.

Generell zeigte sich bei fraktionierter Bestrahlung (1x1Gy, 2x1Gy, 3x1Gy und 4x1Gy) eine etwas stärkere Wirkung der Bestrahlung auf die transfizierte Zellen als bei Einzeldosisbestrahlung (s. Abbildung 40). Die Strahlenreaktion der Zelllinie HTB43 blieb zwar unverändert, doch die Zelllinien HTB35 und MDA-MB-231 wiesen bei fraktionierter Bestrahlung eine deutlichere Strahlenreaktion auf. Die Zelllinie A549 zeigte sowohl mit Wildtyp-*P53* als auch mit überexprimiertem mutiertem *P53* keine oder eine radioprotektive Strahlenreaktion. *BECLINI*-siRNA zeigte bei diesem Versuch in den Zelllinien HTB43 eine schwache radiosensitivierende Wirkung, während diese siRNA bei Einzeldosisbestrahlung keinen Effekt zeigte. Der radioprotektive Eindruck bei den Zelllinien MDA-MB-231 und A549 mit Einzeldosisbestrahlung wurde bei fraktionierter Bestrahlung auf ein Nullniveau gesenkt. Die siRNAs für *APG3* und *APG4B* führten bei fraktionierter Bestrahlung zu einer höheren Strahlensensitivierung in den Zelllinien HTB43, HTB35 und MDA-MB-231. Die siRNAs für *Apg4C*, *Apg5* und *Apg12* jedoch zeigten in allen Zelllinien bei fraktionierter Bestrahlung keine gesteigerte Wirkung verglichen zur siCONTROL non-targeting siRNA.





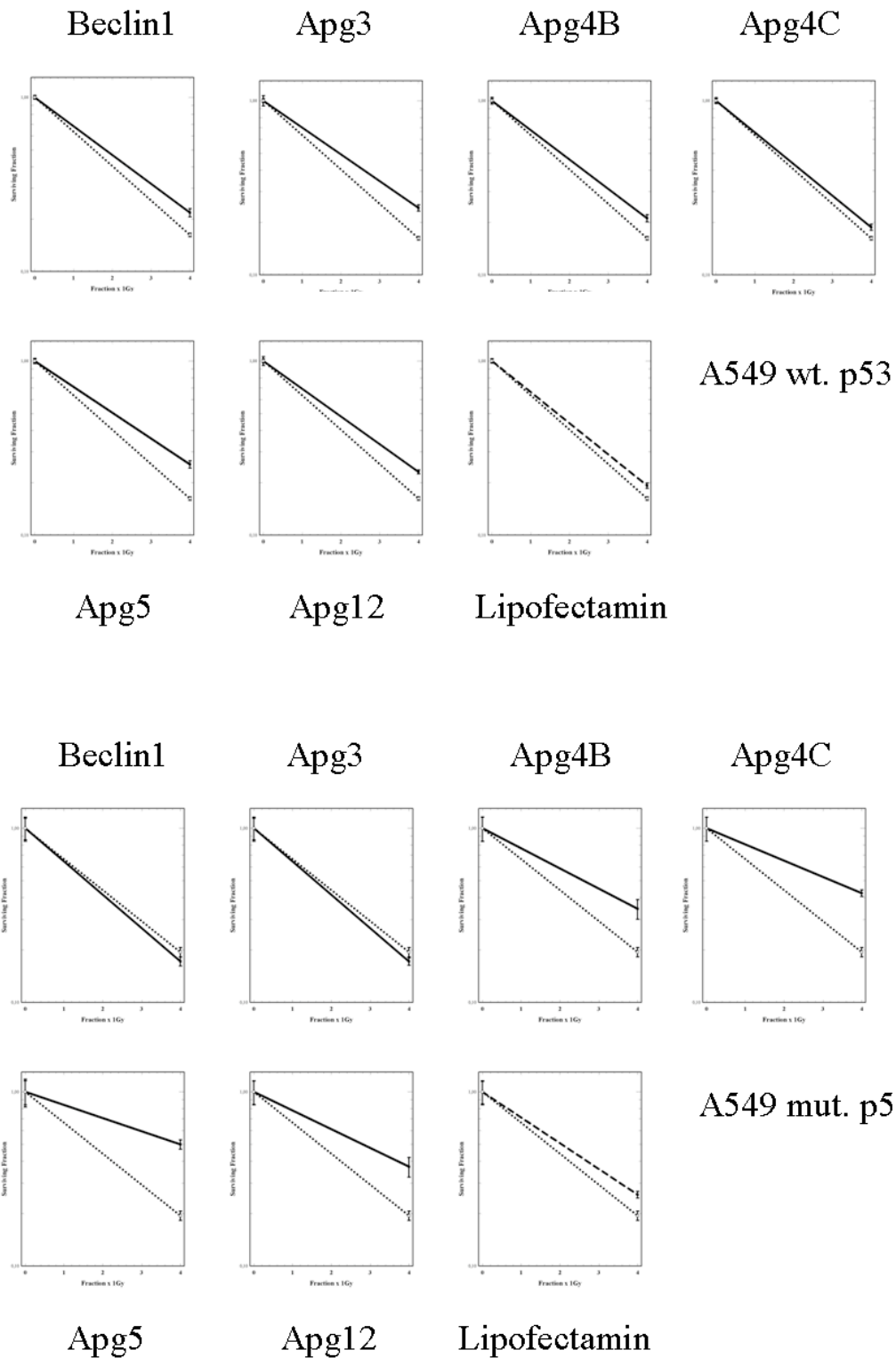


Abbildung 40: Dosis-Wirkungskurve mit fraktionierter Bestrahlung (1 Gy pro Einzeldosis) im Vergleich zu siCONTROL non-targeting siRNA.

Zellen aller fünf Zelllinien wurden transfiziert. Nach 2 Tagen wurde die erste Dosis (1 Gy) bestrahlt, jede folgende Dosis je 24 Stunden später. Nach der jeweils letzten Bestrahlung wurden die Zellen für Koloniebildungstest (10 Tage) ausgesät (0 Gy mit 200 Zellen/well, 1 Gy mit 500 Zellen/well, 2 Gy mit 600 Zellen/well, 3 Gy mit 700 Zellen/well, 4 Gy mit 800

Zellen/well). Die Graphen zeigen die gepoolten Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten.

- Transfektion mit Target-siRNA
- Transfektion mit si*CONTROL* non-targeting siRNA
- ■ - - Transfektion ohne siRNA (Lipofectamin™)

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion: Vakuolenfunktion bei *Candida albicans*

4.1.1 Die zehn vakuolären Kandidatengene

Es wurden zehn Gene ausgewählt, die eine Funktion in der Vakuolenfusion haben, und ihr Einfluss auf die Virulenz von *Candida albicans* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Genen, die in die Vakuolenfunktion involviert sind, die Vakuolenmorphologie, den Yeast-to-Hypha-Übergang und die Virulenz in *Candida albicans* beeinflusst. Die Virulenz der Stämme korreliert mit dem Grad der vakuolären Fragmentierung (vgl. Abbildung 8) und ihrer Hyphenlänge (vgl. Abbildung 16 und Abbildung 17). Diese Korrelation trifft auch auf den Vergleich verschiedener vakuolärer Biogenesemutanten zu. Die homozygoten Mutanten der Gene *CAVAC8*, *CAVAM7*, *CAVPS33*, *CAVTC1*, *CAVTC3/2* und *CAVTC4* besaßen Vakuolenmorphologie und Virulenz wie der Wildtyp SC5314. Die vakuolären Phänotypen der homozygoten Mutanten *CANYV1D* und *CAVPS41D* zeigten geringfügig vergrößerte Vakuolen, die Virulenz dieser Stämme entsprach aber der des Wildtyps. Die homozygote Deletionsmutante des t-SNAREs *CaVAM3* wies verkleinerte Vakuolen und eine leicht reduzierte Virulenz verglichen zur heterozygoten Mutante und dem revertierten Stamm auf. Homozygote Deletionsmutanten der Rab-GTPase *CaYPT7* wiesen eine starke Fragmentierung des vakuolären Kompartiments auf. Die Induktion der Hyphenbildung mit Serum und Transfer zu 37 °C zeigte keine Unterschiede in der Menge der hyphenbildenden Zellen, jedoch die maximale Länge der induzierten Hyphen wich in *CaYPT7D* signifikant ab. Ein intaktes vakuoläres Kompartiment schien daher zwar nicht für die Hypheninduktion, aber wohl für deren Expansion benötigt zu werden. Das Ausmaß der Störung des vakuolären Kompartiments korrelierte mit der Virulenz der Stämme. Die heterozygote *CaYPT7*-Deletionsmutante und der revertierte Stamm zeigten Hyphenexpansion und Virulenz wie der Wildtypstamm, dagegen

zeigte die homozygote Deletionsmutanten, die ihre Hyphen nicht korrekt verlängern konnte, eine deutlich reduzierte Virulenz.

4.1.2 Vakuolenmorphologie, Vakuolenfunktion und Hyphenwachstum

Die Vakuolenmorphologie der heterozygoten und homozygoten Deletionsmutanten in *Candida albicans* stimmte mit den entsprechenden Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae* überein. Den einzigen Unterschied stellte die Mutante CAVAM3D dar, die nur eine moderate Fragmentierung aufwies, während die *VAM3*-Deletion in *S. cerevisiae* zu komplett fragmentierten Vakuolen führt (Wada *et al.*, 1992). Die signifikante Differenz in der Morphologie zwischen der *YPT7*- und *VAM3*-Mutante in *Candida* wurde zuvor in *S. cerevisiae* beschrieben. Dies wird damit begründet, dass die Rab-GTPase Ypt7p für die Aufrechterhaltung des vakuolären Kompartiments wichtiger als das t-SNARE Vam3p ist. Vakuoläre Strukturen resultieren aus einem Gleichgewicht zwischen Membranfragmentierung, Membranfusion und Vakuolentransport entlang Aktinfilamenten. Für diesen Unterschied sind zwei Erklärungen möglich: 1. Die *VAM3*-Deletion blockiert die Fusion und behindert auch die Vakuolenfragmentierung, während die *YPT7*-Deletion nur die Fusion hemmt. 2. Es gibt eine geordnete Ereignisabfolge bei der Fusion. Zuerst werden Vesikel über Aktin in Kontakt gebracht, die daraufhin aneinander binden (Tethering) und schließlich in eine räumlich nahe Anordnung gebracht werden (Docking) und fusionieren. Solange Vesikel Kontakt zueinander aufnehmen, können spontane Fusionsereignisse auftreten. Sogar nach der Inaktivierung von Proteinen, die das Docking und die Fusion erleichtern (z.B. das t-SNARE Vam3p), bleibt eine gewisse basale Fusionsrate bestehen, die vermutlich genügt, um eine extreme Fragmentierung des vakuolären Kompartiments zu verhindern, wie sie in *YPT7*-Deletionsmutanten beobachtet wird (Eitzen *et al.*, 2000) (Kucharczyk *et al.*, 2001). Rab-GTPasen wie Ypt7p regulieren sowohl die Beweglichkeit als auch das Tethering von Organellen. Daher beseitigt eine *YPT7*-Deletion die absolut notwendigen initialen Schritte, die den Vakuolen-Vakuolen-Kontakt einleiten, und zeigt somit den ausgeprägtesten Phänotyp (Eitzen *et al.*, 2000) (Müller *et al.*, 2001) (Wang *et al.*, 2003).

Die graduellen Unterschiede der Vakuolenmorphologie sind aufgrund der verschiedenen Hintergrundstämme bei den beiden Spezies schwer zu beurteilen. Das Kandidatengen (orf 6.9162), das als Homolog zu *S. cerevisiae* *VAM3* ausgewählt wurde, zeigt 26 % Identität. Es gibt noch zwei weitere mögliche Gene (orf 6.2307 und orf 6.5194), deren Identität 23 % bzw. 28 % beträgt, und die die *CaVAM3*-Deletion möglicherweise zu einem gewissen Grad kompensieren können. Die Auswahl des Kandidatengens (orf 6.9162) für diese Studie basiert auf

der höchsten strukturellen Ähnlichkeit zur DNA-Sequenz (z.B. Syntaxin- und SNARE-Domäne) des *S. cerevisiae* *VAM3*. Die vakuoläre Fragmentierung der *VAM3*-Deletionsmutante in *C. albicans* war nicht so markant wie in *S. cerevisiae*, könnte aber auf den Stamm und Hintergrund zurückzuführen sein.

Der dramatische Effekt der CAYPT7D-Mutante trat unabhängig vom Hindergrundstamm deutlich zu Tage. Die *YPT7*-Deletion resultierte sowohl in *Candida albicans* (diese Arbeit) als auch in *Saccharomyces cerevisiae* (Eitzen *et al.*, 2000) in einem klaren Phänotyp.

In der Literatur gibt es bereits einige Hinweise für eine kritische Rolle der Vakuolenfunktion in der Pathogenese von *Candida albicans*. Palmer *et al.* (2003) bestätigten, dass *Vps11*-vermittelter Transport für eine normale Filamentbildung in *C. albicans* benötigt wird. Die homozygote Deletion der Phosphatidylinositol 3-Kinase *Vps34*, die mit der vakuolären H⁺-ATPase interagiert, führte zu einem kompletten Wachstumsstopp bei pH 8,0 (Eck *et al.*, 2005). Die V-ATPase-Komponente *Vma7p* beeinflusste zelluläre Funktionen wie die Ansäuerung der Vakuole und Transportprozesse in die Vakuole. Diese zellulären Funktionen wirkten sich auf das Hyphenwachstum und die Virulenz von *C. albicans* aus (Poltermann *et al.*, 2005). Der Zellzyklus von *C. albicans* ist fest in die Regulation des morphogenetischen Prozesses der Hyphenbildung und des Wachstums *in vivo* einbezogen. Der Verlust des vakuolären Abg1-Proteins führte zu Defekten der Cytokinese, diese verursachten ein verändertes Knospungswachstum und erhöhten die Septenfrequenz bei der Hyphenbildung. Durch das Abg1-Protein wurden Vakuolenbiogenese mit zellulärer Morphogenese, Zellwandbiosynthese und Zellzyklusprogression verknüpft, die alle zu den Virulenzfaktoren in *C. albicans* zählen (Veses *et al.*, 2005). Die Deletion des vakuolären ABC-Transporters *Mtl1p* senkte die Virulenz im Maus-Peritonitis-Modell (Theiss *et al.*, 2002). Dieser kleine Transporter für organische Anionen ist in die Stressantwort und die Detoxifizierung von Substanzen einbezogen, die während einer Infektion von Phagozyten des Wirtsorganismus produziert werden.

Auch in anderen pathogenen Hefen wie *Cryptococcus neoformans* wird die Vakuolenfunktion mit der Virulenz assoziiert. Eine Deletion der vakuolären Cu,Zn-Superoxiddismutase *Sod1p* resultierte in fragmentierten Vakuolen, während der Wildtypstamm normale Vakuolenmorphologie aufwies. In einem Maus-Meningoencephalitis-Modell zeigten *sod1*-Mutanten eine reduzierte Virulenz (Narasipura *et al.*, 2003).

Der Yeast-to-Hyphae-Übergang wird als Hauptursache für die Pathogenität von *Candida albicans* angesehen. Die phänotypische Variabilität bietet die Plastizität, die für eine schnelle Adaptation auf umweltbedingte Veränderungen, einschließlich medikamentöse Therapie,

Immunantwort, Ortswechsel im Körper und Änderungen der Physiologie des Wirts, notwendig ist (Soll, 2002). Das Umschalten beeinflusst eine Vielzahl an virulenten Merkmalen wie Antigenität, Adhäsion an Säugerzellen, Gewebepenetration, Zellyse von Neutrophilen und Makrophagen, Proteinasesekretion und Sensitivität gegenüber Oxidanzien und Medikamenten (Soll, 2002) (An *et al.*, 2004). Es wurde bereits festgestellt, dass reduziertes Hyphenwachstum mit einer sinkenden Virulenz in *Candida albicans* korreliert (Lee *et al.*, 2004).

SIT4-Mutanten (serine/threonine protein phosphatase) konnten die Hyphenelongation unter hypheninduzierenden Bedingungen zwar initiieren, aber konnten das Hyphenwachstum nicht aufrechterhalten. Im Mausmodell für systemische Candidosis zeigten die homozygoten *SIT4*-Deletionsmutanten eine signifikant reduzierte Virulenz. Die Untersuchung der Nieren von Tieren, die mit dem Wildtypstamm oder dem revertierten Stamm infiziert waren, wies hauptsächlich die Hyphenform auf. Die Nieren von Mäusen, die mit der *SIT4*-Deletionsmutante infiziert wurden, waren mit der Yeast-Form angereichert. Diese *in vivo*-Ergebnisse stimmten mit der beobachteten Hemmung der Hyphenelongation *in vitro* überein (Lee *et al.*, 2004). Auch die Deletion des *Wal1*-Proteins (Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog), das für die Organisation des Aktin-Cytoskeletts, Hyphenmorphogenese, Endozytose und Vakuolenmorphologie in *C. albicans* benötigt wird, führte zu einem Defekt in der Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums an der Hyphenspitze (Walther & Wendland, 2004).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente bestätigen die Beteiligung der Vakuolenbiogenese in der Virulenz von *Candida albicans*. Es wurde postuliert, dass die Vakuole eine Schlüsselrolle während der Adaptation eines pathogenen Pilzes an verschiedene Umweltbedingungen im Wirt spielt. In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die Vakuolenfunktion und -struktur per se für Prozesse zellulärer Differenzierung wie den Yeast-to-Hyphae-Übergang benötigt werden, da die Filamentation von einem schnellen Anstieg des Vakuolenvolumens begleitet wird. Neben der Erfüllung physikalischer Aufgaben reduziert oder zumindest verzögert die Vakuolenexpansion den Bedarf an cytoplasmatischer Biosynthese, während sie die schnelle Bildung der Hyphen unterstützt. Dies bestätigt ebenfalls die kritische Rolle der Vakuole in der Pilz-Pathogenese.

4.1.3 *CaVAM3*

In allen Eukaryoten hat man eine Familie konservierter Membranproteine gefunden, die als SNAREs bezeichnet werden (soluble *NSF* attachment protein receptors). SNARE-Proteine besitzen eine Signalsequenz aus 55 Aminosäureresten, denen eine C-terminale Transmembranregion folgt. Das SNARE-Motiv besteht aus einem Bündel von 4 parallelen α -Heli-

ces. Die Bildung von Core-Komplexen durch SNARE-Proteine bringt die zwei Membranen in enge Nähe und forciert dadurch die Fusion. Das SNARE-Motiv von Vam3p ist für die Vakuolenfusion und die SNARE-Komplex-Bildung essentiell. SNARE-Proteine sind direkt an der Fusion beteiligt, sie spielen eine Schlüsselrolle in Docking und Fusion. Die Ausbildung der *trans*-SNARE-Komplexe zwischen den Membranen verschiedener Kompartimente sichert die Spezifität des intrazellulären Membrantransports (Wang *et al.*, 2001) (Dulubova *et al.*, 2001) (Laage & Ungermann, 2001). Vam3p gehört zur Syntaxin-Familie der t-SNAREs und ist an der Vakuolenmembran lokalisiert (Kim & Klionsky, 2000). Die C-terminale Domäne von Vam3p geht bei der Fusion vorübergehend Interaktionen mit Nyv1p ein, dem v-SNARE der gegenüberliegenden Membran. Durch diese Interaktionen wird das vakuoläre Docking stabilisiert (Brown *et al.*, 2003). Der N-Terminus von Vam3p rekrutiert Tethering-Faktoren wie Vps33p (HOPS-Komplex) an die *cis*-SNARE-Komplexe. Dadurch wird der koordinierte Übergang vom Priming zum Tethering sichergestellt (Laage & Ungermann, 2001).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die heterozygote Deletion von *CAVAM3* weder die Wachstumsrate noch die Morphologie oder Virulenz im Vergleich zum Wildtyp ändert. Die homozygote Deletion von *CAVAM3* führte zu einer geringen Vakuolenfragmentierung. Die Wachstumsgeschwindigkeit der homozygoten Mutanten war leicht verzögert, so hatte z. B. *CAVAM3D* eine um 10 % verlängerte Generationszeit im Vergleich zum Wildtypstamm *CAI4*. In Virulenzstudien konnte eine leicht abgeschwächte Pathogenität festgestellt werden, die aber zu gering ist, um *CAVAM3* als Virulenzgen weiterzuverfolgen.

4.1.4 CaYPT7

Ras-artige GTPasen sind kleine monomere Proteine (20-30 kDa), die eine Vielzahl zellulärer Prozesse kontrollieren, von Signaltransduktion und Zellproliferation über Kernimport und Vesikeltransport. Die kleinen GTPasen *YPT* in Hefen bzw. *RAB* in höheren Eukaryoten gehören zu den Schlüsselkomponenten der Transportmaschinerie und tragen zur Spezifität des Vesikeltransports bei. Ypt-Proteine sind in der Membran spezifischer Kompartimente lokalisiert, die Membraninsertion wird über Lipidmodifikationen (zwei Geranylgeranylanker) vermittelt. Wie alle GTPasen bindet und hydrolysiert Ypt7p GTP. Ypt-Proteine wechseln zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven GTP-gebundenen Status. Im GDP-gebundenen Zustand ist Ypt7p cytosolisch und wird durch GDP-Dissoziations-Inhibitoren (Gdi1p oder Sec19p) im abgelösten Zustand gehalten. Im GTP-gebundenen Zustand ist das Protein membrangebunden und interagiert mit spezifischen Effektorproteinen. Die Membranassoziation, die durch Gdi1p kontrolliert wird, extrahiert die GDP-gebundene Form

des Proteins und hilft beim Recycling. Über die Nukleotide werden Ypt-Proteine und damit auch die Effektorproteine zeitlich und räumlich korrekt lokalisiert, daher basiert die Zuverlässigkeit der vesikulären Transportmaschinerie auf dem Konzentrationsverhältnis von GTP- und GDP-gebundenem Status. Der GTP/GDP-Wechsel wird mittels GTPase-activating proteins (GAPs), die die GTP-Hydrolyse beschleunigen, und Guanidin nucleotid exchange factors (GEFs), die GTP gegen GDP austauschen, kontrolliert (Eitzen *et al.*, 2001) (Constantinescu *et al.*, 2002).

Ypt7p ist das einzige Mitglied der Familie, das an der Vakuole lokalisiert ist (Wang *et al.*, 2003). Ypt7p ist in den Transport der späten Endosomen, Cvt-Vesikel und Autophagosomen zur Vakuole involviert und wirkt bei der homotypischen Vakuolenfusion mit (Brown *et al.*, 2003). Die Rab-GTPase *YPT7* vermittelt das Tethering im Membran-Fusionssystem. Obwohl nur die GTP-gebundenen Ypt-Proteine die Effektoren binden, die dann nachfolgende Funktionen übermitteln, spielen ihre GDP-gebundenen Formen ebenfalls eine wichtige Rolle. Das GDP-gebundene Ypt7p kann das vakuoläre Tethering einleiten, während das GTP-gebundene Ypt7p zur Lokalisierung anderer Fusionsfaktoren einschließlich des HOPS-Komplexes, der SNAREs und des Vakuolen-gebundenen Aktins am Scheitel des Tetherings gebraucht wird. Daher spielt Ypt7p eine doppelte Rolle. Es führt unabhängig von SNAREs und Aktin die ersten Schritte des Tetherings durch und etabliert die Spezifität des Dockings. Nach dem Wechsel zu seiner GTP-gebundenen Form depolymerisiert es Aktin und löst die Anlagerung der SNAREs in den Scheitelpunkt aus. Nachdem diese Anlagerung komplett ist, wird Ypt7p nicht mehr länger benötigt, um die Anreicherung anderer Proteine am Scheitelpunkt aufrechtzuerhalten (Eitzen *et al.*, 2001) (Wang *et al.*, 2003).

Obwohl das Gen nicht essentiell ist, führt die Deletion von *YPT7* zu Vakuolenfragmentation und Defekten im Transport von den Endosomen zur Vakuole. Wird Ypt7p durch Mutation im GDP-gebundenen Zustand arretiert, so wird die Vesikelfusion gehemmt, während Mutationen, die den GTP-gebundenen Zustand festhalten, die Fusionsrate steigern (Eitzen *et al.*, 2001) (Constantinescu *et al.*, 2002).

4.1.5 *CaYPT7* als Virulenzfaktor

Die Entwicklung erfolgreicher Strategien für die Behandlung von *C. albicans*-Infektionen ist eine große Herausforderung. Effektive Pilz-Medikamente könnten solche sein, die die Virulenzmechanismen angreifen, die für die Pathogenität dieses Mikroorganismus wichtig sind. Die Strategie der Forschung ist es daher, die Virulenzgene des Pilzes *Candida albicans* zu identifizieren (Lay *et al.*, 1998).

Von Bruckmann *et al.* (2000), Theiss *et al.* (2002), Palmer *et al.* (2003) und Poltermann *et al.* (2005) wurde bereits angedeutet, dass die Vakuolenfunktion und der sekretorische Vesikeltransport zur Vakuole in der Pathogenität dieses Pilzes eine Rolle spielen. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt und weitergeführt werden. Die homozygote Deletion der Rab-GTPase *CaYPT7* führte zu einer starken Fragmentierung des vakuolären Kompartiments. Die Generationszeit von *CaYPT7D* war jedoch nur um 5 % verlangsamt im Vergleich zum Wildtypstamm CAI4. Allerdings wurde in dieser Arbeit nur das Wachstum in Vollmedium unter idealen Bedingungen getestet. *In vivo*, das heißt unter nicht optimalen Bedingungen, könnte die *CaYPT7*-Deletionsmutante durchaus einen deutlichen Wachstumsphänotyp zeigen.

Die Fähigkeit zur Hyphenbildung wurde bei den *CaYPT7*-Mutanten untersucht. Die Länge der gebildeten Hyphen korrelierte mit der Virulenz der entsprechenden Stämme *in vivo*. Da die Hyphenform für die Penetration ins Gewebe und die Verbreitung im Wirtsorganismus wichtig ist, äußert sich ein defektes Hyphenwachstum in der Infektiosität. Die heterozygote Deletionsmutante (*CaYPT7S*) und die Revertierungsmutante (*CaYPT7Re*) konnten Hyphen normaler Länge bilden und wiesen Wildtyp-Virulenz auf. Die homozygoten Deletionsmutanten (*CaYPT7D* und *CaYPT7F*) hatten signifikant verkürzte Hyphen und zeigten eine ebenso dramatisch verminderte Virulenz. Daher kann *CaYPT7* zu den Virulenzgenen von *Candida albicans* gezählt werden.

4.2 Diskussion: Autophagie bei Tumorzellen

4.2.1 Gen-Inhibition durch siRNA und ihr Einsatz in der Therapie

In dieser Arbeit wurde Autophagie spezifisch auf molekularer Ebene gehemmt. Es wurde das RNAi-System genutzt, um gezielt einzelne Autophagie-Gene zu beeinflussen. Während *C. elegans* oder *Drosophila* einfach mit dsRNA injiziert oder mit dsRNA-haltigen Lösungen gefüttert werden können und der RNAi-Effekt zum Teil auch über die Keimbahn in die F₁-Generation übertragen wird, erfolgt die Expressionshemmung im Säugersystem meist nur über 5-9 Tage, bevor das stillgelegte Gen wieder zum normalen Expressionslevel zurückkehrt. Die Effizienz von siRNAs im Silencing der Genexpression eines Zielgens kann variieren, sie hängt von der Halbwertszeit und Häufigkeit des Genprodukts, aber auch von der mRNA-Sequenz und ihrer Zugänglichkeit ab (Hammond *et al.*, 2001) (Zamore, 2001) (Martinez *et al.*, 2002) (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion aller sechs verwendeten siRNAs zu einer stabilen Expressionshemmung autophagischer Gene auf RNA- und Protein-Ebene führt (s. Abbildung 19 und Abbildung 25).

SiRNAs beinhalten ein großes Potenzial als Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Eine Kombinationsbehandlung von siRNA und chemo- oder radiotherapeutischen Agenzien erscheint sehr viel versprechend, um durch das Silencing bestimmter Signalwege intrinsischer Überlebensmechanismen wie z.B. DNA-Reparatur die zelluläre Sensitivität gegenüber DNA-alkylierenden Agenzien und ionisierender Strahlung zu erhöhen (Collis *et al.*, 2003) (Guha *et al.*, 2000). Je nach Bedarf könnte eine transiente Behandlung mittels siRNA-Transfektion oder eine längerfristige Expression mittels Vektorsysteme erfolgreich sein. Trotz ihres therapeutischen Potenzials müssen viele technische Hürden genommen werden, bevor siRNAs als Medikamente verwendet werden können. Dazu zählt ein effizienter Transport in die Zielzellen bzw. Applikation in das Zielorgan unter Umgehung des Immunsystems (Guha *et al.*, 2000) (Collis *et al.*, 2003) (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003).

4.2.2 Autophagie-Induktion nach Bestrahlung

Bestrahlung verursacht Membranschäden, die Bildung von freien Radikalen und DNA-Doppelstrangbrüche. Das Auftreten saurer Kompartimente wie autophagischer Vesikel schützt Zellen gegen Strahlenschäden, indem es die cytoplasmatische Ansäuerung verhindert, Katabolite für Reparaturprozesse bereitstellt, toxische Moleküle und geschädigte Zellbestandteile abbaut, bevor deren Anreicherung den programmierten Zelltod auslösen könnte (Paglin *et al.*, 2001) (Yao *et al.*, 2003).

Die Bildung autophagischer Vakuolen hängt von der Bestrahlungsdosis und von der Zeit nach Bestrahlung ab. Die Vesikelbildung nach Bestrahlung verläuft nach dem gleichen Muster wie reguläre Autophagie (Paglin *et al.*, 2001). Die in dieser Studie verwendete Dosis von 2 Gy zeigte auch bei Daido *et al.* (2005) Wirkung. Nach 2 Gy-Bestrahlung stieg die Anzahl an Autophagosomen im elektronenmikroskopischen Bild dramatisch an, sie enthielten cytoplasmatische Strukturen, lamelläre Strukturen oder Rückstände von verdautem Material (vgl. Abbildung 28).

Die Größe der Autophagosomen, die durch das autophagische Markerprotein GFP-LC3p visualisiert werden können, ist nicht zufällig, sondern wird je nach Zelllinie und Nährstoffbedingungen reguliert (Mizushima, 2004) (Mizushima *et al.*, 2004) (Boya *et al.*, 2005). Embryonale Stammzellen haben große, leicht erkennbare Autophagosomen, gefolgt von F9-Zellen, Fibroblasten, Hepatocyten und Herzmuskelzellen. Dagegen besitzen HeLa-Zellen, Pankreaszellen, Skelettmuskelzellen, Podocyten und Thymusepithelzellen relativ kleine Autophagosomen, die nur als punktförmige Strukturen erkennbar sind.

Bei den in dieser Studie verwendeten Tumorzelllinien war die Autophagosomengröße relativ gering, so dass sie auch bei höchster Vergrößerung nur als punkartige Strukturen erkennbar waren (s. Abbildung 32). Allerdings unterschied sich die Vesikelgröße von Autophagosomen des basalen Zellstoffwechsels deutlich von strahleninduzierten Autophagosomen. Auch der von Kabeya *et al.* (2000) bei Nährstoffmangel beobachtete spürbaren Anstieg der Punkteverteilung konnte für strahleninduzierte Autophagie bestätigt werden. Danach spiegelt sich der durch Nährstoffmangel verursachte LC3-Iip-Fluoreszenzanstieg sowohl in der Anzahl als auch in der Intensität wieder (Codogno & Meijer, 2005). Auch Ito *et al.* (2005) konnte zeigen, dass Bestrahlung die LC3-Iip-Expression steigert und die Ansammlung von LC3-Protein in Autophagosomen induziert (Ito *et al.*, 2005).

Da die Quantifizierung der zahlreichen Fluoreszenzsignale schwierig ist, gibt es für die Extraktion der Punktsignale vom cytosolischen Hintergrund Computerprogramme („Top hat“-Algorithmus von Meta Morph Version6/Molecular Devise) (Mizushima, 2004) (Mizushima *et al.*, 2004). Um den Einfluss der transienten Transfektion im Experiment auszublenden, wurden neben der siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Kontrolle auch eine Lipofectamin™-Kontrolle mitgeführt, so dass alle Zellen den gleichen basalen Autophagie-Level aufwiesen. Eine Computer-gestützte Auswertung der Fluoreszenzsignale war leider nicht möglich, dafür wurde die Vesikelquantifizierung in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 50 Zellen pro Behandlung wiederholt (vgl. Tabelle 15 bis Tabelle 17).

4.2.3 RNAi-Effekte auf die Strahleninduktion autophagischer Vesikel

Im elektronenmikroskopischen Bild konnte deutlich gezeigt werden, dass Transfektion mit siRNAs gegen autophagische Gene den gesamten Autophagie-Prozess hemmte und damit die Ausbildung autophagischer Vesikel nach Strahleninduktion beeinträchtigte (s. Abbildung 30).

Auch in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte ein signifikanter Unterschied der Vesikelinduktion zwischen siCONTROL non-targeting siRNA transfizierten Zellen und Target-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden (vgl. Tabelle 15 bis Tabelle 17). Laut Literatur ist das LC3-Ip-Processing, d.h. die Bildung des LC3-Iip und die Assoziation von LC3-Iip mit der Isolationsmembran vom Apg12p-Apg5p-Konjugat abhängig. Apg5p und Apg12p sollen für die Autophagosomenbildung unbedingt benötigt werden, in *APG12*- oder *APG5*-defizienten Zellen oder Konjugat-defizienten Mutanten soll die LC3-Iip-Isoform nicht gebildet werden oder kann nicht an die Membran binden (George *et al.*, 2000) (Kabeya *et al.*, 2000) (Tanida *et al.*, 2002a) (Mizushima *et al.*, 2003) (Mizushima, 2004) (Tanida *et al.*, 2004). Diese Aussage konnte hier nicht bestätigt werden, in allen Zellen wurden GFP-LC3p-

markierte Autophagosomen gefunden. Da eine Transfektion mit siRNA nie vollständig die mRNA-Expression unterdrückt, könnte vielleicht eine Minimalmenge an Apg5p- bzw. Apg12p-Proteinexpression ausreichen, um auf die strahleninduzierte Stresssituation zu reagieren. Auch Hosokawa *et al.* (2006) bestätigt, dass nur eine komplette Apg5-Suppression zu einer totalen Autophagie-Hemmung führen kann. Mizushima *et al.* (2001) fand bei *APG5*-defizienten Zellen auch eine geringe Autophagie-Aktivität, die er über die verbleibenden autophagischen Signalwege Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie erklärt (Mizushima *et al.*, 2001) (Hosokawa *et al.*, 2006).

4.2.4 RNAi-Effekte auf das zelluläre Überleben

Die Fähigkeit einer Zelle, sich durch Teilung zu reproduzieren, ist für alle biologischen Systeme von zentraler Bedeutung. Fraktionierte Bestrahlung mit niedriger Dosis verursacht keinen Zellzyklusarrest, sondern führt durch die Progression der Zellen in sensitive Phasen des Zellzyklus zur Beeinflussung der potentiell unbegrenzten Teilungsfähigkeit, welche nicht nur die Basis der Tumor-Strahlentherapie bildet, sondern auch für die Bedeutung des Strahlenrisikos eine wichtige Rolle spielt (Kiefer, 1989) (Wheldon, 1994).

Fraktionierte Bestrahlung erlaubt die Repopulation des normalen Gewebes zwischen den einzelnen Dosisfraktionen, die zur Erholung oder Aufrechterhaltung der normalen Organfunktion wichtig ist und dadurch die Toleranz gegenüber der Behandlung erhöht, also die Nebenwirkungen und Spätfolgen reduziert. Natürlich ist auch eine Repopulation überlebender Tumorzellen möglich, die durch eine selektive Hemmung der Proliferation während der Strahlenbehandlung gehemmt werden sollte (Brade & Tannock, 2006).

In dieser Arbeit war fraktionierte Bestrahlung effektiver als Einzeldosisbestrahlung, wobei die Zelllinie HTB43 die stärksten Effekte zeigte. Die Hemmung autophagischer Gene führte auch in den Zelllinien HTB35 und MDA-MB-231 zu einer leichten radiosensitivierenden Reaktion. In der Zelllinie A549 konnte jedoch keine Wirkung der Target-siRNAs im Vergleich zur *siCONTROL* non-targeting siRNA festgestellt werden, unabhängig von der *P53*-Expression.

Eine angemessene Bildung autophagischer Vesikel in überlebenden Kolonien stellt einen Langzeitschutz gegen niedrige Strahlenschäden dar. Die Hemmung der Vesikelbildung oder Vesikelfunktion dient als Werkzeug, um den Zelltod nach niedriger und hoher Strahlungsdosis zu steigern bzw. zu erleichtern (Paglin *et al.*, 2001) (Yao *et al.*, 2003). Experimente mit Bafilomycin A₁ zeigten, dass die Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase, ein Enzym zur Ansäuerung autophagischer Vakuolen, DNA-Degradation vermehrte und das Überleben nach

Bestrahlung signifikant verminderte. Auch die Hemmung der Autophagosomenbildung durch 3-Methyladenin führte zu einer klaren Radiosensitivierung, vermutlich indem die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen gehemmt wurde, und so der Anti-Tumoreffekt der Bestrahlung verstärkt wurde (Paglin *et al.*, 2001) (Ito *et al.*, 2005).

Die Nachkommen bestrahlter Zellen enthalten oft einen erhöhten Level an autophagischen Vakuolen. Die kontinuierliche Zunahme autophagischer Vesikel allerdings könnte die protektiven Effekte umdrehen und zu autophagischem Zelltod führen (Yao *et al.*, 2003).

4.2.5 Autophagie als Ansatzpunkt für die Tumortherapie

Einige Tumorzellen werden durch Autophagie gegen Antitumor-Behandlung geschützt („protektive Autophagie“), in anderen Zellen kann aber auch autophagischer Zelltod als Antwort auf eine Antitumor-Behandlung induziert werden. Tatsächlich kann die Manipulation der Autophagie verschiedene Ausgänge haben: Zellwachstum oder Zelltod, darum wird es wichtig sein, die Mechanismen der Autophagie und ihrer Hemmung besser zu verstehen. Die klinische Onkologie und Krebsforschung muss herausfinden, welche Tumorzelltypen normalerweise Autophagie als Reaktion auf eine Antitumorbehandlung einleiten, und ob eine erhöhte Autophagie-Rate ein Zeichen für Sensitivierung oder Resistenz ist (Kondo *et al.*, 2005) (Ito *et al.*, 2005).

Da Tumoren häufig resistent gegenüber Programmierter Zelltod Typ I sind, könnte die Induktion der Autophagie bzw. des autophagischen Zelltods in Apoptose-defekten oder Apoptose-resistenten Tumorzellen eine therapeutische Alternative darstellen. Es sind noch weitere Studien notwendig, um zu klären, welche Zelltypen durch Typ I PCD sterben, welche durch Typ II und welche beide induzieren können (Kondo *et al.*, 2005) (Eskelinen, 2005).

Der autophagische Verdau von Teilen des Cytoplasmas und Organellen ist in die zelluläre Adaptation an Nährstoffmangel und subletale Schäden involviert. Defekte in der Autophagie haben Anteil an der Karzinogenese, da sie zu einer reduzierten Beseitigung defekter Organellen und beschädigter Zellen führen. Die Unterdrückung der Autophagie durch chemische Inhibitoren, der Knock-down essentieller Gene (*ATG5*, *ATG10* oder *ATG12*) oder Hemmung des Klasse III PI3-Kinase-Komplexes (*BECLIN1*-Knock-down oder 3-Methyladenin) hemmt die Ausbildung autophagischer Vakuolen und sensitiviert Zellen gegen Nährstoffmangel-induzierten Zelltod. Die Autophagie-Hemmung sensitiviert Zellen auch durch die Erschöpfung obligater Wachstums- oder Überlebensfaktoren, die in einem sinkenden Nährstoffimport über die Plasmamembran resultiert (Kroemer & Jäättelä, 2005) (Eskelinen, 2005).

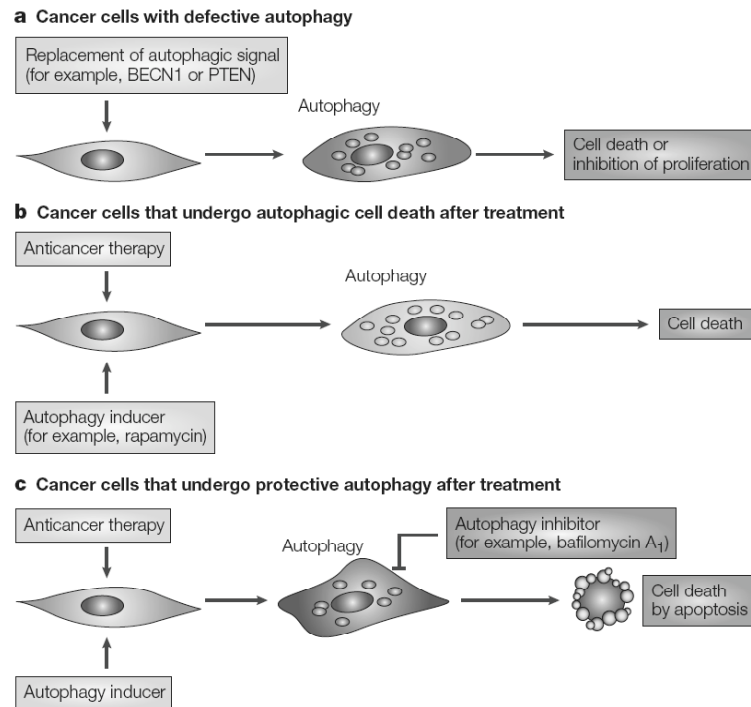


Abbildung 41: Die Manipulation der Autophagie besitzt das Potenzial, eine Antitumorbehandlung zu unterstützen. Nach (Kondo *et al.*, 2005).

A) In Zellen mit Autophagie-Defekt kann die Substitution des autophagischen Signals durch Expression von *BECLIN1* oder des Tumorsuppressorgens *PTEN* Autophagie induzieren und zu Zelltod oder Wachstumshemmung führen. B) In Tumorzellen, die Autophagie als Antwort auf eine Antitumorbehandlung aktivieren, kann die Induktion z.B. durch Rapamycin autophagischen Zelltod auslösen. C) In Zellen, die sich mittels Autophagie vor den Effekten einer Antitumorbehandlung schützen, kann durch Autophagie-Inhibitoren (Bafilomycin A₁ oder siRNAs für spezifische Autophagie-Gene) Apoptose induziert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte in zwei unterschiedlichen Systemen die Rolle des Lysosoms bzw. der Vakuole als Ansatzpunkt für therapeutische Anwendungen gezeigt werden.

In den Studien zu *Candida albicans* konnte gezeigt werden, dass die Pilz-Vakuole und ihre Funktion einen Einfluss auf die Virulenz von *Candida albicans* haben. Um das zu prüfen, wurden zehn Gene ausgewählt, deren Funktion in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist. Ihre Sequenzen wurde im *C. albicans*-Genom identifiziert. Die Gene wurden in *C. albicans* deletiert und die entstandenen Null-Mutanten auf ihre Morphologie hin untersucht. Die Integrität der Hyphen wurde durch Induktion des Yeast-to-Hyphae-Übergangs analysiert. Alle Stämme wurden im Mausmodell für systemische Candidosis auf ihre Virulenz getestet.

Die Deletion von Genen, die für die Erhaltung der vakuolären Integrität wichtig sind, beeinflusst die Vakuolenmorphologie, den Yeast-to-Hyphae-Übergang und die Virulenz im Mausmodell für systemische Candidosis. Die Minderung der Virulenz korreliert mit dem Grad der Vakuolenfragmentierung und -funktion. Die Deletion der Rab-GTPase *CaYPT7* führte zu einer starken Fragmentierung des vakuolären Kompartiments, einer signifikant verkürzten Hyphenlänge und einer drastisch reduzierten Virulenz. Diese Arbeit belegt, dass die Vakuolenbiogenese und ihre Funktion direkt in die Virulenz des Pilzes *Candida albicans* involviert sind. Das macht dieses Zellkompartiment zu einem Ansatzpunkt für antifungale Therapien.

In den Studien zu Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass die Autophagie und ihre Funktion einen Einfluss auf die Strahlenreaktion humaner Tumorzelllinien haben. Um das zu prüfen, wurden sechs Gene ausgewählt, die in die Bildung des Autophagosoms involviert sind. Ihre Expression wurde spezifisch mittels siRNAs gehemmt. Die Hemmung der Genexpression wurde auf RNA- und Proteinebene hin untersucht. Die Fähigkeit transfizierter Zellen zur Autophagosomenbildung nach Bestrahlung wurde elektronenmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Beeinflussung des klonogenen Überlebens transfizierter Tumorzellen nach Bestrahlung wurde im Koloniebildungstest geprüft.

Die Geninhibition mittels siRNA führte zu einer stabilen Expressionshemmung. Die Hemmung von Genen, die für die Ausbildung der Autophagosomen wichtig sind, beeinflusste qualitativ und quantitativ die zelluläre Morphologie. Die Strahlenreaktion humaner Tumorzellen *in vitro* nach Hemmung der Autophagie führte bei fraktionierter Bestrahlung zu einer Radiosensitivierung in den Zelllinien HTB43 und HTB35 und zu einer moderaten Strahlen-

reaktion in der Zelllinie MDA-MB-231. Diese Arbeit belegt, dass die Autophagie einen essentiellen Schutzmechanismus humaner Tumorzellen gegenüber Bestrahlung darstellt, und ihre Funktion direkt in die klonogene Überlebensfähigkeit der Zellen involviert ist. Dies macht Autophagie zu einem Ansatzpunkt für Antitumorthérapien, speziell für die Kombinationstherapie mit Bestrahlung.

SUMMARY

This work showed in two different systems the role of the lysosome and the vacuole as targets for therapeutical application.

In the *Candida albicans* studies it could be shown that the fungal vacuole and its function influence virulence of *Candida albicans*. Therefore, ten candidate genes with known function in *Saccharomyces cerevisiae* were selected and their sequences were identified in the *Candida albicans* genome. The genes were deleted in *C. albicans* and the morphology of the resulting null mutants was analyzed. Hyphal integrity was examined by yeast-to-hyphae transition. The virulence of all strains was tested in the mouse model for systemic candidosis.

The deletion of genes required for maintenance of vacuolar integrity influenced vacuolar morphology, the yeast-to-hyphae transition, and virulence in a mouse model for systemic Candidosis. The reduction of virulence correlated with the degree of vacuolar fragmentation and function. Deletion of the Rab-GTPase *CaYPT7* led to a strong fragmentation of the vacuolar compartment, a significant reduction in hyphal length, and a drastically decreased virulence. This work shows that vacuole biogenesis and function are directly involved in virulence of *Candida albicans*. That makes this cell compartment a target for antifungal therapy.

In the studies with tumour cells it could be shown that autophagy and its function influence the radiation reaction of human tumour cell lines. To proof this, six genes involved in autophagosome formation were selected. Their expression was specifically inhibited by siRNAs. The inhibition of gene expression was tested on RNA and protein level. The ability of transfected cells to autophagosome formation after irradiation was analyzed by electron and fluorescence microscopy. The impact of transfected tumour cells on clonogenic survival after irradiation was examined by colony formation assay.

Gene inhibition by siRNA led to a stable blocking of expression. The inhibition of genes required for autophagosome formation influenced cellular morphology qualitatively and quantitatively. The radiation reaction after fractionated irradiation of human tumour cells *in vitro* after inhibition of autophagy led to a radiosensitization in the cell lines HTB43 and HTB35 and to a moderate radiation reaction in the cell line MDA-MB-231. This work shows that autophagy represents an essential defence mechanism of human tumour cells against irradiation, and its function is directly involved in cellular survivability. This makes autophagy a target for anti-tumour therapy especially in combination with irradiation.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004).** Molecular biology of the cell. *Wiley-VCH Verlag GmbH&Co KGaA, Weinheim* **4. Edition**.
- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M. & Simon, S. M. (1998).** Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 1583-1598.
- Alva, A. S., Gultekin, S. H. & Baehrecke, E. H. (2004).** Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death and Differentiation* **11**, 1046-1048.
- An, H.-S., Lee, K.-H. & Kim, J. (2004).** Identification of an exoribonuclease homolog, *CaKEM1/CaXRN1*, in *Candida albicans* and its characterization in filamentous growth. *FEMS Microbiology Letters* **235**, 297-303.
- Anderson, R. G. W. & Orci, L. (1988).** A view of acidic intracellular compartments. *The Journal of Cell Biology* **106**, 539-543.
- Ashford, T. P. & Porter, K. R. (1962).** Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *Journal of Cell Biology* **12**, 198-202.
- Baehrecke, E. H. (2005).** Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 505-510.
- Bahn, Y. S., Staab, J. F. & Sundstrom, P. (2003).** Increased high-affinity phosphodiesterase *PDE2* gene expression in germ tubes counteracts *CAP1*-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **50**, 391-409.
- Banta, L. M., Vida, T. A., Herman, P. K. & Emr, S. D. (1990).** Characterization of yeast Vps33p, a protein required for vacuolar protein sorting and vacuole biogenesis. *Molecular & Cellular Biology* **10**, 4638-4649.
- Barelle, C. J., Bohula, E. A., Kron, S. J., Wessels, D., Soll, D. R., Schäfer, A., Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (2003).** Asynchronous cell cycle and asynchronous vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **2**, 398-410.
- Bayer, M. J., Reese, C., Bühler, S., Peters, C. & Mayer, A. (2003).** Vacuole membrane fusion: V_0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca^{2+} -releasing channel. *Journal of Cell Biology* **162**, 211-222.
- Berman, J. & Sudbery, P. E. (2002).** *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics* **3**, 918-932.
- Blankenship, J. R., Wormley, F. L., Boyce, M. K., Schell, W. A., Filler, S. G., Perfect, J. R. & Heitman, J. (2003).** Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in seum and virulence. *Eukaryotic Cell* **2**, 422-430.
- Bliss, J. M., Sullivan, M. A., Malone, J. & Haidaris, C. G. (2003).** Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using recombinant human antibody single-chain variable fragments specific for hyphae. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1152-1160.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.-A., Casares, N. & other authors (2005).** Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular & Cellular Biology* **25**, 1025-1040.
- Brade, A. M. & Tannock, I. F. (2006).** Schedule of radiation and chemotherapy for limited-stage small-cell lung cancer: Repopulation as a cause of treatment failure? *Journal of Clinical Oncology* **24**, 1020-1022.

- Brown, C. R., Liu, J., Hung, G. C., Carter, D., Cui, D. & Chiang, H. L. (2003).** The vesicle to vacuole trafficking event requires components of the SNARE membrane fusion machinery. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 25688-25699.
- Bruckmann, A., Künkel, W., Härtl, A., Wetzker, R. & Eck, R. (2000).** A phosphatidylinositol 3 kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth and virulence. *Microbiology* **146**, 2755-2764.
- Bruckmann, A., Künkel, W., Augsten, K., Wetzker, R. & Eck, R. (2001).** The deletion of *CaVPS34* in human pathogenic yeast *Candida albicans* causes defects in vesicle-mediated protein sorting and nuclear segregation. *Yeast* **18**, 343-353.
- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001).** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* **9**, 327-335.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martinez, J. P. (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 130-180.
- Codogno, P. & Meijer, A. J. (2005).** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1509-1518.
- Collis, S. J., Swartz, M. J., Nelson, W. G. & DeWeese, T. L. (2003).** Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Research* **63**, 1550-1554.
- Colombo, M. I. (2005).** Pathogens and autophagy: Subverting to survive. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1481-1483.
- Constantinescu, A. T., Rak, A., Alexandrov, K., Esters, H., Goody, R. S. & Scheidig, A. J. (2002).** Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases. *Structure* **10**, 569-579.
- Crnkovic-Mertens, I., Hoppe-Seyler, F. & Butz, K. (2003).** Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* **22**, 8330-8336.
- Cuervo, A. M. (2004).** Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biology* **14**, 70-77.
- Davis, D. A., Bruno, V. M., Loza, L., Filler, S. G. & Mitchell, A. P. (2002).** *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* **162**, 1573-1581.
- De Duve, C. (1959).** Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. *Subcellular Particles*, 128-159.
- Dietrich, L. E., LaGrassa, T. J., Rohde, J., Cristodero, M., Meiringer, C. T. & Ungermann, C. (2005).** ATP-independent control of Vac8 palmitoylation by a SNARE subcomplex on yeast vacuoles. *Journal of Cell Biology* **280**, 15348-15355.
- Douglas, L. J. (2003).** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* **11**, 30-36.
- Dulubova, I., Yamaguchi, T., Wang, Y., Sudhof, T. C. & Rizo, J. (2001).** Vam3p structure reveals conserved and divergent properties of syntaxins. *Nature Structural Biology* **8**, 258-264.
- Dunn, W. A. J. (1990a).** Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *The Journal of Cell Biology* **110**, 1923-1933.

- Dunn, W. A. J. (1990b).** Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of Cell Biology* **110**, 1935-1945.
- Eck, R., Nguyen, M., Gunther, J., Kunkel, W. & Zipfel, P. F. (2005).** The phosphatidylinositol 3-kinase Vps34p of the human pathogenic yeast *Candida albicans* is a multifunctional protein that interacts with the putative vacuolar H⁺-ATPase subunit Vma7p. *International Journal of Medical Microbiology* **295**, 57-66.
- Edinger, A. L. & Thompson, C. B. (2003).** Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* **4**, 422-424.
- Eitzen, G., Will, E., Gallwitz, D., Haas, A. & Wickner, W. (2000).** Sequential action of two GTPases to promote vacuole docking and fusion. *The EMBO Journal* **19**, 6713-6720.
- Eitzen, G., Thorngren, N. & Wickner, W. (2001).** Rho1p and Cdc42p act after Ypt7p to regulate vacuole docking. *The EMBO Journal* **20**, 5650-5656.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001).** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Eskelinen, E. L., Prescott, A. R., Cooper, J., Brachmann, S. M., Wang, L. J., Tang, X., Backer, J. M. & Lucocq, J. M. (2002).** Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic* **3**, 878-893.
- Eskelinen, E. L. (2005).** Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1468-1472.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J. & Jin, S. (2005).** The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *PNAS* **102**, 8204-8209.
- Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J. W. & Seglen, P. O. (1995).** Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Experimental Cell Research* **221**, 504-519.
- George, M. D., Baba, M., Scott, S. V., Mizushima, N., Garrison, B. S., Ohsumi, Y. & Klionsky, D. J. (2000).** Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 969-982.
- Gonzalez-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L. & other authors (2005).** The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of Cell Science* **118**, 3091-3102.
- Gow, N. A. R., Brown, A. J. P. & Odds, F. C. (2002).** Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 366-371.
- Gozuacik, D. & Kimchi, A. (2004).** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891-2906.
- Guertin, A. D. & Sabatini, D. M. (2005).** An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine* **11**, 353-361.
- Guha, C., Guha, U., Tribius, S., Alfieri, A., Casper, D., Chakravarty, P., Mellado, W., Pandita, T. K. & Vikram, B. (2000).** Antisense *ATM* gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumors. *Gene Therapy* **7**, 852-858.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A. & Hannon, G. J. (2001).** Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* **2**, 110-119.

- Harding, T. M., Morano, K. A., Scott, S. V. & Klionsky, D. J. (1995).** Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm-to-vacuole protein targeting pathway. *The Journal of Cell Biology* **131**, 591-602.
- Hay, N. (2005).** The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* **8**, 179-183.
- Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M. & Ploegh, H. L. (2003).** A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 51841-51850.
- Holtzman, E. (1989).** Lysosomes (Cellular organelles). *New York: Plenum Press*.
- Hosokawa, N., Hara, Y. & Mizushima, N. (2006).** Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. *FEBS letters* **580**, 2623-2629.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. & Jouault, T. (2003).** *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of Bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 13086-13093.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T. & other authors (2000).** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492.
- Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S. & Kondo, Y. (2005).** Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *International Journal of Oncology* **26**, 1401-1410.
- Iwaguchi, S.-I., Suzuki, M., Sakai, N., Nakagawa, Y., Magee, P. T. & Suzuki, T. (2004).** Chromosome translocation induced by the insertion of the *URA* blaster into the major repeat sequence (MRS) in *Candida albicans*. *Yeast* **21**, 619-634.
- Jin, Y., Samaranayake, Y. H., Yip, H. K. & Samaranayake, L. P. (2005).** Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* **160**, 191-200.
- Jong, A. Y., Chen, S. H. M., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L. & Huang, S. H. (2003).** Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology* **52**, 615-622.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2000).** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal* **19**, 5720-5728.
- Kiefer, J. (1989).** Biologische Strahlenwirkung. Eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung. *Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin* **2. Auflage**, 155-177.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2001).** Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the *trans*-Golgi network. *EMBO Reports* **2**, 330-335.
- Kim, J. & Klionsky, D. J. (2000).** Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annual Reviews Biochemistry* **69**, 303-342.
- Klionsky, D. J. & Emr, S. D. (2000).** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-1721.
- Klionsky, D. J. (2005a).** Autophagy. *Current Biology* **15**, R282-283.

- Klionsky, D. J. (2005b).** The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Science* **306**, 990-995.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. & Kondo, S. (2005).** The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer* **5**, 726-734.
- Korting, H. C., Hube, B., Oberhauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C. & Schaller, M. (2003).** Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *Journal of Medical Microbiology* **52**, 623-632.
- Kroemer, G. & Jäättelä, M. (2005).** Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews Cancer* **5**, 886-897.
- Krueger, K. E., Ghosh, A. K., Krom, B. P. & Cihlar, R. L. (2004).** Deletion of the *NOT4* gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiology* **150**, 229-240.
- Kucharczyk, R., Kierzek, A. M., Slonimski, P. P. & Rytka, J. (2001).** The Ccz1 protein interacts with Ypt7 GTPase during fusion of multiple transport intermediates with the vacuole in *S. cerevisiae*. *Journal of Cell Science* **114**, 3137-3145.
- Kumanomidou, T., Mizushima, T., Komatsu, M. & other authors (2006).** The crystal structure of human Atg4b, a processing and de-conjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers. *Journal of Molecular Biology* **355**, 612-618.
- Laage, R. & Ungermann, C. (2001).** The N-terminal domain of the t-SNARE Vam3p coordinates priming and docking in yeast vacuole fusion. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 3375-3385.
- Lay, J., Henry, L. K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C. E. & Becker, J. M. (1998).** Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infection and Immunity* **66**, 5301-5306.
- Lee, C.-M., Nentel, A., Jiang, L., Whiteway, M. & Shen, S.-H. (2004).** The serine/threonine protein phosphatase *SIT4* modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **51**, 691-709.
- Levine, B. & Klionsky, D. J. (2004).** Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell* **6**, 463-477.
- Levine, B. & Yuan, J. (2005).** Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 2679-2688.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B. & Levine, B. (1998).** Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by Beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology* **72**, 8586-8596.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. & Levine, B. (1999).** Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1*. *Nature* **402**, 672-676.
- Liang, X. H., Yu, J., Brown, K. & Levine, B. (2001).** Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Research* **61**, 3443-3449.

- Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M. & Piper, R. C. (2000).** Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of Cell Science* **113**, 1515-1524.
- Majeski, A. E. & Dice, J. F. (2004).** Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2435-2444.
- Marino, G., Uria, J. A., Puente, X. S., Quesada, V., Bordallo, J. & Lopez-Otin, C. (2003).** Human Autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 3671-3678.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T. (2002).** Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-574.
- Mayer, A. & Wickner, W. (1997).** Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NSF). *Journal of Cell Biology* **136**, 307-317.
- Mayer, A. (1999).** Intracellular membrane fusion: SNAREs only? *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 447-452.
- Meijer, A. J. & Codogno, P. (2004).** Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2445-2462.
- Mendelson, M. (2001).** Fungal infections in the immunocompromised. *Microbiology Today* **28**, 10-12.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2001).** Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of Cell Biology* **152**, 657-668.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. (2003).** Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 553-561.
- Mizushima, N. (2004).** Methods for monitoring autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2491-2502.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. (2004).** *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1101-1111.
- Morschhäuser, J., Michel, S. & Staib, P. (1999).** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Molecular Microbiology* **32**, 547-556.
- Müller, O., Johnson, D. I. & Mayer, A. (2001).** Cdc42p functions at the docking stage of yeast vacuole membrane fusion. *The EMBO Journal* **20**, 5657-5665.
- Müller, O., Bayer, M. J., Peters, C., Andersen, J. S., Mann, M. & Mayer, A. (2002).** The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0)-trans-complex formation. *The EMBO Journal* **21**, 259-269.
- Müller, O., Neumann, H., Bayer, M. J. & Mayer, A. (2003).** Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *Journal of Cell Science* **116**, 1107-1115.
- Mullins, C. & Bonifacino, J. S. (2001).** The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**, 333-343.

- Munafò, D. B. & Colombo, M. I. (2001).** A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of Cell Science* **114**, 3619-3629.
- Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y. & Wada, Y. (1997).** Vam2/Vps41p and Vam6/Vps39p are components of a protein complex on the vacuolar membranes and involved in the vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 11344-11349.
- Narasipura, S. D., Ault, J. G., Behr, M. J., Chaturvedi, V. & Chaturvedi, S. (2003).** Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Molecular Microbiology* **47**, 1681-1694.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. & Pla, J. (2001).** Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 245-268.
- Ogier-Denis, E. & Codogno, P. (2003).** Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1603**, 113-128.
- Ohsumi, Y. (2001).** Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 211-216.
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Spiccas, E., Domingo, D. & Yahalom, J. (2001).** A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Research* **61**, 439-444.
- Palmer, G. E., Cashmore, A. & Sturtevant, J. (2003).** *Candida albicans* *VPS11* is required for vacuole biogenesis and germ tube formation. *Eukaryotic Cell* **2**, 411-421.
- Palmer, G. E., Johnson, K. J., Ghosh, S. & Sturtevant, J. (2004).** Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in *Candida albicans* distinguish between growth and filamentation. *Microbiology* **150**, 1911-1924.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. & Levine, B. (2005).** Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939.
- Peters, C. & Mayer, A. (1998).** Ca^{2+} /calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* **396**, 575-580.
- Peters, C., Baars, T. L., Bühler, S. & Mayer, A. (2004).** Mutual control of membrane fission and fusion proteins. *Cell* **119**, 667-678.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F. C., Meijer, A. J. & Codogno, P. (2000).** Distinct classes of phosphatidylinositol 3-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 992-998.
- Petiot, A., Pattingre, S., Arico, S., Meley, D. & Codogno, P. (2002).** Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Structure and Function* **27**, 431-441.
- Poltermann, S., Nguyen, M., Gunther, J., Wendland, J., Hartl, A., Kunkel, W., Zipfel, P. F. & Eck, R. (2005).** The putative vacuolar ATPase subunit Vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development and virulence. *Microbiology* **151**, 1645-1655.

- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G. & other authors (2003).** Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin1* autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation* **112**, 1809-1820.
- Radisky, D. C., Snyder, W. B., Emr, S. D. & Kaplan, J. (1997).** Characterization of *VPS41*, a gene required for vacuolar trafficking and high-affinity iron transport in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5662-5666.
- Raught, B., Gingras, A.-C. & Sonenberg, N. (2001).** The target of rapamycin (TOR) proteins. *PNAS* **98**, 7037-7044.
- Ravikumar, B., Stewart, A., Kita, H., Kato, K., Duden, R. & Rubinsztein, D. C. (2003).** Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Human Molecular Genetics* **12**, 985-994.
- Rez, G., Toth, S. & Palfia, Z. (1999).** Cellular autophagic capacity is highly increased in azaserine-induced premalignant atypical acinar nodule cells. *Carcinogenesis* **20**, 1893-1898.
- Rich, K. A., Burkett, C. & Webster, P. (2003).** Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cellular Microbiology* **5**, 455-468.
- Sato, T. K., Darsow, T. & Emr, S. D. (1998).** Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Molecular & Cellular Biology* **18**, 5308-5319.
- Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S. & Munz, C. (2006).** Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *Journal of Molecular Medicine* **84**, 194-202.
- Seeley, E. S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W. & Eitzen, G. (2002).** Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 782-794.
- Sheikh, M., Feig, J., Gee, B., Li, S. & Savva, M. (2003).** *In vitro* lipofection with novel series of symmetric 1,3-dialkoylamidopropane-based cationic surfactants containing single primary and tertiary amine polar head groups. *Chemistry and Physics of Lipids* **124**, 49-61.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. & Tsujimoto, Y. (2004).** Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology* **6**, 1221-1228.
- Shintani, T., Suzuki, K., Kamada, Y., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2001).** Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 30452-30460.
- Shintani, T. & Klionsky, D. J. (2004).** Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science* **306**, 990-995.
- Soll, D. R. (2002).** *Candida* commensalism and virulence: The evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* **81**, 101-110.
- Staab, J. F. & Sundstrom, P. (2003).** *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends in Microbiology* **11**, 69-73.

- Subramanian, S., Woolford, C. A. & Jones, E. W. (2004).** The Sec1/Munc18 protein, Vps33p, functions at the endosome and the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 2593-2605.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2001).** The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO Journal* **20**, 5971-5981.
- Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., Passannante, M., Wicky, C., Streit, A., Kovacs, A. L. & Müller, F. (2005).** Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Current Biology* **15**, 1513-1517.
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., T., K., Aoki, H., Mills, G. B. & Kondo, S. (2005).** Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Research* **65**, 3336-3346.
- Tanida, I., Nishitani, T., Nemoto, T., Ueno, T. & Kominami, E. (2002a).** Mammalian Apg12p, but not the Apg12p* Apg5p conjugate, facilitates LC3 processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**, 1164-1170.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T. & Kominami, E. (2002b).** Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 13739-13744.
- Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. (2004).** LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2503-2518.
- Tassa, A., Roux, M. P., Attaix, D. & Bechet, D. M. (2003).** Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C₂C₁₂ myotubes. *Biochemical Journal* **376**, 577-586.
- Theiss, S., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., Agabian, N., Hacker, J. & Köhler, G. A. (2002).** Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type *Candida albicans* reveals its involvement in virulence. *Molecular Microbiology* **43**, 571-584.
- Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A. & Vierstra, R. D. (2005).** Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the *ATG8* and *ATG12* conjugation pathways. *Plant Physiology* **138**, 2097-2110.
- Thompson, A. R. & Vierstra, R. D. (2005).** Autophagic recycling: Lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 165-173.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. & Wolf, D. H. (1994).** Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **349**, 275-280.
- Tsukada, M. & Ohsumi, Y. (1993).** Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **333**, 169-174.
- Ungermann, C. & Wickner, W. (1998).** Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion. *The Embo Journal* **17**, 3269-3276.
- van Burik, J. A. H. & Magee, P. T. (2001).** Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Review of Microbiology* **55**, 743-772.

- Veit, M., Laage, R., Dietrich, L., Wang, L. & Ungermann, C. (2001).** Vac8p release from the SNARE complex and its palmitoylation are coupled and essential for vacuole fusion. *The EMBO Journal* **20**, 3145-3155.
- Veses, V., Casanova, M., Murgui, A., Dominguez, A., Gow, N. A. R. & Martinez, J. P. (2005).** *ABG1*, a novel and essential *Candida albicans* gene encoding a vacuolar protein involved in cytokinesis and hyphal branching. *Eukaryotic Cell* **4**, 1088-1101.
- Wada, Y. & Anraku, Y. (1992).** Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. *VAM7*, a gene for regulating morphogenic assembly of the vacuoles. *J Biol Chem* **267**, 18671-18675.
- Wada, Y., Ohsumi, Y. & Anraku, Y. (1992).** Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and characterization of two classes of vam mutants. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 18665-18670.
- Wall, N. R. & Shi, Y. (2003).** Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *The Lancet* **362**, 1401-1403.
- Walther, A. & Wendland, J. (2004).** Polarized hyphal growth in *Candida albicans* requires the Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog Wal1p. *Eukaryotic Cell* **3**, 471-482.
- Wang, L., Merz, A. J., Collins, K. M. & Wickner, W. (2003).** Hierarchy of protein assembly at the vertex ring domain for yeast vacuole docking and fusion. *Journal of Cell Biology* **160**, 365-374.
- Wang, Y., Dulubova, I., Rizo, J. & Sudhof, T. C. (2001).** Functional analysis of conserved structural elements in yeast syntaxin Vam3p. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 28598-28605.
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N. & Rubinsztein, D. C. (2003).** α -synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 25009-25013.
- Wheldon, T. E. (1994).** Targeting radiation to tumours. *International Journal of Radiation Biology* **65**, 109-116.
- Wickner, W. (2002).** Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *The EMBO Journal* **21**, 1241-1247.
- Willis, A. M., Coulter, W. A., Fulton, C. R., Hayes, J. R., Bell, P. M. & Lamey, P. J. (2001).** The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* **91**, 317-321.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W. & Hall, M. N. (2005).** Molecular organization of Target of Rapamycin Complex 2. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 30697-30704.
- Yao, K. C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S. & Germano, I. M. (2003).** Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *Journal Neurosurgery* **98**, 378-384.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. & Lenardo, M. J. (2004).** Regulation of an *ATG7-beclin1* program of autophagic cell death by Caspase-8. *Science* **304**, 1500-1502.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. (2003). *Beclin 1*, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *PNAS* **100**, 15077-15082.

Zamore, P. D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Structural Biology* **8**, 746-750.

Zheng, X., Wang, Y. & Wang, Y. (2004). Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *The EMBO Journal* **23**, 1845-1856.

7 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Anja S. Apel, geb. Hobler

geboren am 28.01.1977 in Mangalore (Indien)

Schulbildung

1983-1987 Grundschule Königsknoll, Sindelfingen

1987-1996 Stiftsgymnasium Sindelfingen

Abschluss: Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

1996-1997 Heilpädagogischer Kindergarten Paulinenpflege Stuttgart

Studium und Doktorarbeit

1997-2002 Biologie-Studium an der Eberhard Karls Universität Tübingen

1999 Vordiplom

1999-2001 Hauptstudium mit Hauptfach: Humangenetik,
Nebenfächer: Zellbiologie und Pharmakologie

2001-2002 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl Allgemeine Humangenetik des Humangenetischen Instituts der Universität Tübingen (Abteilung Prof. Dr. Jost Kömpf, Prof. Dr. Jürgen Tomiuk) zum Thema „Charakterisierung einer Methioninadenosyltransferase (EC. 2.5.1.6) aus Rattenniere“

2002 Diplom

2002-2006 Anfertigung der Doktorarbeit am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft Tübingen (AG Prof. Dr. Andreas Mayer) in Kooperation mit der Sektion Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung des Universitätsklinikums Tübingen (AG Prof. Dr. H. Peter Rodemann) zum Thema „Das lysosomale Kompartiment als Ansatzpunkt für therapeutische Anwendungen“