

**Mikroautophagischer Abbau von Teilen der Kernhülle und
Untersuchungen zum Transport und der Aktivität von
Atg15p in der Hefe *S. cerevisiae***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Yvonne Mühe
aus Northeim

Göttingen 2007

D7

Referent: Prof. Dr. von Figura

Korreferent: Prof. Dr. Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2007

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. ZUSAMMENFASSUNG	6
SUMMARY	8
2. EINLEITUNG.....	10
2.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus.....	10
2.2 Protein-Transportwege zur Vakuole in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.2.1 Lösliche Proteasen.....	11
2.2.2 Membrangebundene Proteine.....	12
2.2.2.1 Transport über das späte Endosom	12
2.2.2.2 Transport der Alkalischen Phosphatase.....	13
2.3 Fusion mit der Vakuolenmembran.....	13
2.3.1 Homotypische Vakuolenfusion.....	14
2.4 Cvt-Weg und Autophagie.....	16
2.4.1 Makroautophagie	18
2.4.1.2 Die putative Lipase Atg15p.....	21
2.4.2 Mikroautophagie	22
2.4.2.1 Mikropexophagie	22
2.5 Mikroautophagischer Abbau des Zellkerns und von Teilen des Kern-ER– „piecemeal microautophagy of the nucleus“	24
2.6 Zielsetzung der Arbeit.....	26
3. MATERIAL UND METHODEN.....	28
3.1 Material.....	28
3.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	28
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	30
3.1.3 Plasmide	31
3.1.4 Oligonucleotide	32
3.1.5 Wachstumsmedien.....	34
3.1.6 Antikörper.....	36
3.1.7 Kits	36
3.1.8 Chemikalien	37
3.1.9 Geräte	39

3.2 Methoden	40
3.2.1 Wachstum von Hefezellen	40
3.2.1.1 Wachstumsbedingungen für Hefezellen.....	40
3.2.1.2 Dauerkulturen von Hefezellen	40
3.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte	40
3.2.1.4 Bestimmung der Abbaurate von GFP-Osh1p in Deletionsstämmen.....	41
3.2.1.5 Bestimmung des Abbaus von Kupfer-induzierten Markerproteinen.....	41
3.1.2.6 Bestimmung des Abbaus von GFP-Osh1p in temperatursensitiven Stämmen.....	42
3.2.2 Transformation von Hefezellen	42
3.2.3 Isolierung von DNA aus Hefezellen.....	43
3.2.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefezellen	43
3.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe (Plasmid Rescue)	43
3.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	44
3.2.4.1 Wachstum von <i>E. coli</i> -Kulturen	44
3.2.4.2 <i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	44
3.2.4.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
3.2.4.4 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	45
3.2.4.5 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse	45
3.2.4.6 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> mit dem Wizard Plus SV Kit.....	46
3.2.4.7 Restriktionsverdau von DNA	46
3.2.4.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	46
3.2.4.9 Gelextraktion von DNA (<i>Gel Extraction Kit</i>).....	47
3.2.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten	47
3.2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
3.2.4.12 Reinigung von PCR-Produkten	48
3.2.4.13 Sequenzierung von DNA.....	48
3.2.4.14 <i>In vitro</i> -Mutagenese mit dem QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit.....	48
3.2.4.15 Southern Blot Analyse.....	49
3.2.5 Proteinchemische Methoden.....	51
3.2.5.1 Alkalische Lyse von Hefezellen	51
3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
3.2.5.3 Western Blot Analyse	52
3.2.5.4 Indirekte Immunfluoreszenz	53
3.2.6 Zellbiologische Methoden	54
3.2.6.1 Vesikeltest.....	54
3.2.6.2 Färbung der vakuolären Membran mit FM4-64	55
3.2.6.3 Färbung des Zellkerns mit Hoechst 33342	55
3.2.6.4 Färbung der Sprossnarben von <i>S. cerevisiae</i> mit Lectin-TRITC	55
3.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Autophagie-Mutanten.....	56
3.2.7.1 Fixierung mit Paraformaldehyd.....	56
3.2.7.2 Fixierung mit Kaliumpermanganat.....	56
4. ERGEBNISSE	57
4.1 Mikroautophagischer Abbau von Teilen des Kern-ER in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
4.1.1 PMN als autophagischer Prozess	57
4.1.2 PMN benötigt die Atg-Proteine der Autophagie-Induktion und der Autophagosomen-Bildung.....	64
4.1.3 PMN benötigt den für die Autophagie essentiellen PtdIns-3-Komplex I.....	66

4.1.4	PMN benötigt die Funktion von Atg18p und das FRRG-Motiv von Atg21p	66
4.1.5	PMN benötigt spezielle Komponenten des Cvt-Weges.....	69
4.1.6	PMN benötigt Komponenten der homotypischen Vakuolenfusion	71
4.1.7	Die vakuoläre ATPase und LMA1 sind nicht an PMN beteiligt.....	73
4.1.8	Vergleich von PMN mit Mikroauto- und Mikropexophagie.....	74
4.1.9	Das Cdc48p-bindende Protein Shp1p wird für PMN benötigt	75
4.2	Untersuchungen zur Lokalisierung, der Aktivität und dem Transport von Atg15p	78
4.2.1	Direkte Lokalisierung von Atg15p	78
4.2.1.1	Klonierung der Konstrukte	78
4.2.1.2	GFP-Atg15p ist biologisch aktiv, Atg15p-GFP ist in seiner Aktivität reduziert.....	79
4.2.1.3	Überexpression von GFP-Atg15p führt zur ER-Proliferation	81
4.2.2	Direkte Lokalisierung C-terminal verkürzter GFP-Atg15p-Konstrukten	83
4.2.2.1	Klonierung der Konstrukte	83
4.2.2.2	Überprüfung der biologischen Aktivität von verkürzten GFP-Atg15p-Konstrukten	84
4.2.3	Abhängigkeit der Atg15p-Aktivität vom Serin an Position 332	86
4.2.3.1	Klonierung der Konstrukte	86
4.2.3.2	Das Serin in Position 332 ist für die biologische Aktivität von Atg15p essentiell	87
4.2.3.3	ALP-Atg15p $_{\Delta TMD}$ hemmt das Zellwachstum	88
4.2.3.4	Autophagie ist am Abbau stark überexprimierter Proteine beteiligt.....	89
4.2.3.5	ALP-Atg15p hat keinen Einfluss auf <i>APM3</i> -defiziente Zellen	90
4.2.3.6	Die Überexpression von ALP-Atg15p $_{\Delta TMD}$ und ALP-Atg15p $_{\Delta TMD}^{S332A}$ ist in <i>vps11Δ</i> -Zellen letal.....	91
4.2.4	Transport von Sna3p und Atg15p im MVB-Weg	92
4.2.4.1	Der Transport von Sna3p erfolgt unabhängig von dem Lysin an Position 125.....	93
4.2.4.	Untersuchungen zur Ubiquitinierung von Atg15p und dem Einfluss des PxY-Motivs auf die Atg15p-Sortierung.....	94
4.2.4.3	Atg15p-HA ist nicht ubiquitiniert und auch ohne PxY-Motiv biologisch aktiv	95
5.	DISKUSSION.....	98
5.1	Mikroautophagischer Abbau des Kern-ER in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 98	
5.2	Untersuchungen zur Lokalisierung, Aktivität und zum Transport von Atg15p	108
6.	LITERATURVERZEICHNIS	116
	DANKSAGUNG	127
	LEBENS LAUF	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A, Ala	Alanin
AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
AP	Adapterproteinkomplexe
Ape1p	Aminopeptidase I
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
Atg	Autophagie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cps1	Carboxypeptidase S
CPY	Carboxypeptidase Y
CUP	Kupfersulfat-induzierter Promotor
Cvt	Cytoplasm to vacuole targeting
ddH ₂ O	Zweifach deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
GAL	Galaktose
GARP	golgi-associated retrograde protein complex
GEF	Guanosin-Austausch Faktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequoria victoria</i>
Glu	Glukose
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
K, Lys	Lysin
KAc	Kaliumacetat
KAN ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar (1M = 1 mol/L)
Met	Methionin
min	Minute
MIPA	micropexophagy specific membrane apparatus

mM	Millimolar (1 mM = 1 mmol/L)
MVB	Multivesicular Body
N	Amino-
NC	Nitrocellulose
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitive Faktor
NV	nucleus-vacuolar
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OSBP	Oxysterol-bindende Proteine
P.	<i>Pichia</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Präautophagosomale Struktur
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Tween 20“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
Pep4	Proteinase A
Pgk	3-Phosphoglyceratkinase
PMN	piecemeal microautophagy of the nucleus
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
<i>Pp</i>	<i>Pichia pastoris</i>
Prb1	Proteinase B
proApe1p	Proaminopeptidase 1
PtdIns	Phosphatidyl-Inositol
R, Arg	Arginin
RT	Raumtemperatur
S, Ser	Serin
S.	<i>Saccharomyces</i>
sec	Sekunde
SNAP	soluble NSF association protein
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
TAP	tandem affinity purification
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TOR	Target of Rapamycin
ts	Temperatur-sensitiv
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
v / v	Volumenprozent
V-ATPase	Vakuoläre Protonenpumpe
VFT	Vps fifty three tethering complex
Vps	vacuole protein sorting
VTC	Vacuolar transporter chaperone
w / v	Massenprozent
WT	Wildtyp
xg	x-fache Erdbeschleunigung
Y, Tyr	Tyrosin

1. ZUSAMMENFASSUNG

Autophagie ermöglicht eukaryotischen Zellen ein Überleben bei Nährstoffmangel. Im Verlauf der Makroautophagie entstehen doppelmembranlagige Autophagosomen, die Teile des Cytosols oder auch Organellen enthalten. Sie fusionieren mit der Vakuole bzw. dem Lysosom und entlassen die inneren, autophagischen Vesikel in deren Lumen. Dort werden die Vesikel und ihr Inhalt schließlich abgebaut. Während der Mikroautophagie stülpt sich die Vakuolenmembran direkt nach innen ein und schnürt Vesikel in das Lumen ab.

Der Abbau von Teilen des Zellkerns und der Kernmembran (ER) durch PMN (piecemeal microautophagy of the nucleus) ist ein mikroautophagischer Prozess. Ausgehend von Kontaktstellen zwischen der Vakuolenmembran und dem endoplasmatischen Retikulum um den Zellkern kommt es bei PMN zur Invagination der Vakuolenmembran, welche die sich bildenden ER-Vesikel einhüllt. Anschließend erfolgt die Lyse der gebildeten Vesikel, bestehend aus der vakuolären Membran und Teilen der ER-Membran, im Innern der Vakuole. PMN wurde durch die Arbeitsgruppe von D.S. Goldfarb bisher als ein von den Autophagie (ATG)-Genen unabhängiger Prozess beschrieben. Diese Arbeit zeigt anhand von Untersuchungen mit dem an den Kontaktstellen angereicherten Markerprotein GFP-Osh1p, dass es sich bei PMN um eine spezielle Form der Mikroautophagie handelt und anders als seither angenommen nahezu alle der zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Autophagie-Proteine an PMN beteiligt sind. Dabei spielen vor allem die für die Autophagosomen-Bildung notwendigen Proteine eine zentrale Rolle für PMN. Die meisten dieser Proteine können zumindest vorübergehend an der präautophagosomalen Struktur (PAS), dem Ort der Autophagosomen-Biogenese, lokalisiert werden. Der Cvt-Weg (cytoplasm to vacuole targeting) ist ein konstitutiver Transportweg für die vakuolären Proteine Proaminopeptidase I und α -Mannosidase. Die dabei entstehenden doppelmembranlagigen Vesikel sind kleiner als die Autophagosomen. Der Cvt-Weg nutzt viele der Komponenten, die auch für hungerinduzierte Autophagie notwendig sind. Es gibt jedoch einige für den Cvt-Weg spezifische Gene. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch einzelne der speziell für den Cvt-Weg notwendigen Proteine für den spezifischen Abbau von Teilen des Zellkerns durch PMN essentiell sind. Atg11p,

das spezifisch für die Bildung von Cvt-Vesikeln ist, wird für PMN benötigt. Der Rezeptor der Proaminopeptidase I, Atg19p, ist hingegen nicht an PMN beteiligt. Da sehr viele der Komponenten des selektiven Cvt-Weges gebraucht werden, ist PMN also kein typischer makroautophagischer Prozess. Um während PMN Vesikel in das Lumen der Vakuole entlassen zu können, müssen zwei Arten von Membranfusionen erfolgen. Zum einen fusionieren die beiden ER-Membranen. An ihrer Fusion ist typischerweise Cdc48p beteiligt. An PMN sind Cdc48p und sein Interaktionspartner Shp1p beteiligt. Zum anderen ist eine Fusion der Vakuolenmembran notwendig. Es konnte nachgewiesen werden, dass PMN das für eine homotypische Vakuolenfusion notwendige NSF Sec18p und das α -SNAP Sec17p, die charakteristischen SNARE-Proteine sowie den HOPS-Komplex benötigt.

Atg15p ist an der Lyse von autophagischen Vesikeln im Lumen der Vakuole beteiligt. Das Protein enthält das Konsensusmotiv von Serin-Lipasen und wird über den MVB-Weg zur Vakuole transportiert. In dieser Arbeit wurden N- sowie C-terminale GFP-Fusionen von Atg15p erzeugt. Die Fusionsproteine ermöglichen eine direkte Lokalisierung des Atg15p. Eine Überexpression von GFP-Atg15p führte zu einer Proliferation des ER. Die Erzeugung C-terminal verkürzter Versionen von GFP-Atg15p ermöglichte Hinweise auf die an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren. Um zu testen, ob Atg15p an den MVB-Vesikeln lokalisiert sein muss, um biologisch aktiv zu sein, wurde eine Chimäre erzeugt, die an der vakuolären Membran lokalisiert ist (ALP-Atg15p). Die Expression der Chimäre beeinträchtigte das Wachstum der Zellen. Daher wurde auch eine biologisch inaktive Chimäre durch den Austausch des aktiven Serins im Atg15p gegen Alanin erzeugt. Das inaktive Konstrukt zeigt, dass das Serin für die lytische Aktivität von Atg15p essentiell ist. Proteinase A und B sind ebenfalls notwendig für die Lyse in der Vakuole. Beide Proteine könnten an der Reifung von Atg15p beteiligt sein. Wachstumstests zeigten, dass die Chimäre ALP-Atg15p das Zellwachstum auch ohne Proteinase A hemmt. Der Transport von Atg15p und dem Protein Sna3p über den MVB-Weg erfolgt Ubiquitin-unabhängig. Sna3p kann jedoch durch die Ubiquitin-Ligase Rsp5p ubiquitiniert werden, für die Interaktion ist ein PxY-Motiv notwendig. Diese Ubiquitin-Konjugation ist zwar nicht für den Transport von Sna3p zu MVB Vesikeln nötig, erhöht aber wohl die Effizienz. Dieses Motiv findet sich auch in Atg15p. Die hier durchgeführte Mutagenese des Motivs lieferte erste Hinweise auf dessen Funktion für die Sortierung von Atg15p.

SUMMARY

Autophagy is a ubiquitous process, occurring in all eukaryotic cells. It serves as a response to stress such as nutrient limitation. Macroautophagy involves the formation of cytosolic double-membrane vesicles, termed autophagosomes that sequester portions of cytoplasm or organelles. Fusion of the autophagosomes with the lysosome (vacuole) results in the delivery of a vesicle (autophagic body) into its lumen. Microautophagy sequesters cytoplasm or organelles by invagination or septation of the vacuolar membrane.

In *Saccharomyces cerevisiae* the piecemeal microautophagy of the nucleus (PMN) degrades nonessential portions of the nucleus. PMN is induced by starvation and occurs at nucleus-vacuole (NV) junctions. A portion of the nucleus is extruded along the NV-junctions into an invagination of the vacuolar membrane, forming a tethered bleb. Scission of the ER and fusion of the vacuolar membrane releases a PMN-vesicle into the vacuole lumen where it is degraded by resident hydrolases. In the group of D.S. Goldfarb PMN was first described as a *bona fide* microautophagic process that occurs independently of *ATG* gene products.

In this study the essential function of most of the *ATG* gene products during PMN is uncovered. I show that PMN is a specific kind of microautophagy and depends on the participation of the autophagic machinery. Especially the proteins necessary for the induction and the vesicle nucleation during autophagy are important for PMN. Most of these proteins form the pre-autophagosomal structure called PAS, the formation site of the autophagosomes.

The cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway is a biosynthetic pathway used for the delivery of the resident vacuolar hydrolase aminopeptidase I. The Cvt pathway uses most of the components needed for the degradative autophagic pathway. Furthermore there are some Cvt-specific proteins, which here are shown to be also needed during PMN.

Scission of the PMN vesicles releases a tri-lamellar PMN-vesicle into the vacuolar lumen, whose outermost membrane is derived from portions of the vacuolar membrane and whose double bilayer comes from the ER, which in yeast also forms

the nuclear envelope. At least two membrane fusions are necessary to form these PMN-vesicles. Cdc48p is the NSF, which together with its interaction partner Shp1 mediates ER fusions. This study shows that Shp1p, which interacts with Cdc48p, is necessary for PMN. PMN further depends on proteins involved in the homotypic vacuole fusion: the SNARE proteins, the proteins of the HOPS complex, the NSF Sec18p as well as the α -SNAP Sec17p.

The integral membrane protein Atg15p is a putative lipase essential for intravacuolar lysis of autophagic bodies. Atg15p reaches the vacuole via the MVB pathway. The protein contains a serine in a consensus lipase active site. The generation of C- or N-terminally GFP-tagged Atg15p allows a direct localization of the protein in the ER and the lumen of the vacuole. The overexpression of GFP-Atg15p leads to a significant ER proliferation. Studies on C-terminally truncated versions of GFP-Atg15p may help to identify the putative catalytic triad residues.

To test whether the localization of Atg15p to the MVB-vesicles is necessary for its activity, a fusionprotein was generated that is localized at the vacuolar membrane (ALP-Atg15p). The expression of the chimeric protein disturbed the growth of the cells. Therefore an inactive form of the fusionprotein was generated. The active serine residue in Atg15p was changed into an alanine. The resulting fusionprotein lost its biological activity. Proteinase A and B are also necessary during the lysis of autophagic vesicles in the vacuole. Both proteins could be involved in the maturation of Atg15p. The present study shows that the activity of ALP-Atg15p is independent of Proteinase A.

Different mechanisms for entry of proteins into the MVB pathway are known. Sna3p and Atg15p are transported in an ubiquitin-independent manner. Nevertheless the sorting of Sna3p is controlled by a PxY-motif leading to an interaction with the ubiquitin ligase Rsp5p. Atg15p also contains a PxY-motif. A mutation of the motif has no effect on the functionality of Atg15p but the protein seems to be mislocated within the cells.

2. EINLEITUNG

2.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die einzellige Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zur Familie der Sprosspilze. Als eukaryotischer Organismus enthält sie neben dem Zellkern alle charakteristischen Kompartimente wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Peroxisomen, Mitochondrien und eine zum tierischen Lysosom analoge Vakuole.

Die Zellen sind für genetische Studien besonders geeignet, da sie eine haploide und eine diploide Vermehrungsphase durchlaufen. Haben zwei haploide Zellen einen unterschiedlichen Paarungstyp (α bzw. a), können sie sich vereinigen und eine diploide Zelle bilden. Die Zellen können sich durch Sprossung, also mitotische Zellteilungen vermehren. Bei Nährstoffmangel tritt eine meiotische Zellteilung der diploiden Zellen auf. Dabei bilden sich in einem Ascus eingeschlossen vier haploide Sporen, die eine Dauerform der Hefe darstellen. Bei einer Verbesserung der Wachstumsbedingungen vermehren sich die Zellen wieder vegetativ.

Verteilt auf 16 Chromosomen enthält das haploide Hefegenom etwa 14 Millionen Basenpaare mit ca. 6000 offenen Leserahmen [2]. Die Hefe ist aufgrund ihres kleinen haploiden Genoms, der geringen Anzahl an Chromosomen und der kurzen Verdopplungsrate von etwa 90 Minuten ein idealer Modellorganismus für molekulargenetische Untersuchungen. Viele stark konservierte Stoffwechselwege und zelluläre Prozesse lassen sich von *S. cerevisiae* direkt auf höhere Eukaryonten übertragen [3].

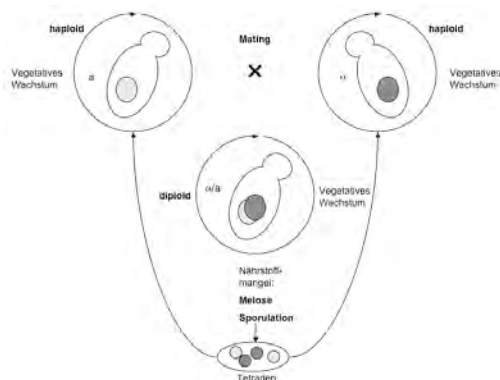


Abbildung 2.1: Zellzyklus der Hefe

2.2 Protein-Transportwege zur Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae*

Eines der wichtigsten Kennzeichen eukaryotischer Zellen ist die Kompartimentierung. Sie ermöglicht eine Arbeitsteilung innerhalb der Zelle, gegensätzliche Prozesse können gleichzeitig ablaufen. Dabei bieten die Kompartimentsbarrieren gleichzeitig eine kontrollierte Durchlässigkeit.

Ein für die Physiologie von *S. cerevisiae* zentrales Kompartiment ist die Vakuole. Sie ist unter anderem beteiligt an der pH- und Osmoregulation, an der Speicherung von z.B. Aminosäuren, an der Sporulation und lytischen Abbauprozessen. Für diese Aufgaben befinden sich zahlreiche Proteine in der Vakuole, die auf ganz unterschiedlichen Transportwegen in die Vakuole gelangen. Oft handelt es sich dabei um den sekretorischen Transportweg. Dabei werden die Proteine cotranslational an den Ribosomen in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Sie werden in Vesikeln zwischen ER und dem Golgi-Apparat transportiert, unterliegen dort verschiedenen Modifikationen und erreichen schließlich in Vesikeln ihre Zielmembran [4].

2.2.1 Lösliche Proteasen

Einige vakuoläre Hydrolasen werden zunächst als inaktive Zymogene synthetisiert und erst in der Vakuole proteolytisch aktiviert. Ein Beispiel dafür ist Proteinase A (codiert durch das Strukturgen *PEP4*). Ein N-terminales, hydrophobes Signalpeptid wird nach der Translokation ins ER abgespalten. Das Protein wird glykosiliert, im Golgi-Apparat weiter modifiziert und erreicht schließlich in der Proform die Vakuole. Dort wird das Propeptid in einer pH-abhängigen, autokatalytischen Reaktion zur aktiven Hydrolase gereift [5]. Proteinase A ist unter anderem an der Reifung von Proteinase B und Carboxypeptidase Y beteiligt [6].

2.2.2 Membrangebundene Proteine

2.2.2.1 Transport über das späte Endosom

Das späte oder auch multivesikuläre Endosom (multivesicular body; MVB) ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von internen, membranumhüllten Vesikeln. Sie entstehen durch die Invagination der Endosomenmembran und das Abschnüren von Vesikeln in das Lumen [7]. Die Fusion der MVBs mit der Vakuolenmembran führt zur Freisetzung der luminalen Vesikel in das Innere der Vakuole. Dort werden die Vesikel und ihr Inhalt abgebaut. Membranproteine werden in der äußeren Membran des MVB-Vesikels transportiert.

An der Bildung der MVB-Vesikel in Hefe sind die so genannten Klasse E Vps-Proteine (*VPS*; vacuolar protein sorting) beteiligt. Sie sind hochkonserviert und bilden vier cytoplasmatische Proteinkomplexe (ESCRT-Komplexe; endosomal sorting complex required for transport). Der ESCRT-0 Komplex besteht aus Vps27p und Hse1p. Beide enthalten Motive, die mit Ubiquitin interagieren [8]. Vps27p wird über seine FYVE-Domäne zur endosomalen Membran rekrutiert und bindet Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P). Dann rekrutiert es den ESCRT-I-Komplex. Das ubiquitinierte Cargo wird vom ESCRT-I und dem ESCRT-II-Komplex erkannt. Der ESCRT-III-Komplex wird für die Verpackung des Cargos in die inneren Vesikel benötigt. Doa4p deubiquitiniert zuvor das Cargo. Die AAA-Typ ATPase (ATPases associated with diverse cellular activities) Vps4p katalysiert die Ablösung der ESCRT-Komplexe, ehe die MVB-Vesikel abgeschnürt werden [9]. Retroviren wie z.B. HIV-1 benötigen die Klasse E Proteine für das Budding und die Freisetzung der viralen Partikel [10]. Weiterhin ist beschrieben, dass MVB-Vesikel eine Rolle bei der Antigenpräsentation in der Immunantwort spielen [11].

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass Monoubiquitinierung als Signal für die Sortierung über den MVB-Weg dient [12], [13], [14]. Procarboxypeptidase S, codiert durch *CPS1*, wird in MVB-Vesikeln in die Vakuole transportiert. Dafür wird das Lysin 8 durch die Protein-Ligase Tul1p mit Ubiquitin konjugiert. Mit Bsd2p wird eine alternative Möglichkeit zur Ubiquitinierung von Cps1p beschrieben [15]. Bsd2p hat ein PPXY-Motiv, das die HECT-Ubiquitin-Ligase Rsp5p binden kann. Auch für den Abbau einiger Plasmamembranproteine spielt der MVB-Weg eine wichtige Rolle. Sie

gelangen nach Monoubiquitinierung über Endocytose zum späten Endosom und somit zum Abbau in die Vakuole. Reggiori und Pelham zeigten zunächst, dass im Falle von des Proteins Sna3p keine Ubiquitinierung für den Transport im MVB-Weg notwendig ist [12]. McNatt *et al.* und Oestreich *et al.* konnten inzwischen zeigen, dass eine direkte Ubiquitinierung von Sna3p zwar nicht notwendig ist, den MVB-Transport aber unterstützt [16], [17]. Sie identifizierten weitere Sortiersignale für den Transport von Sna3p. Dazu gehören eine Tyrosin-haltige Region und ein PPAY-Motiv in der cytosolischen carboxyterminalen Domäne, welche ebenfalls mit Rsp5p interagiert.

2.2.2.2 Transport der Alkalischen Phosphatase

Das integrale Membranprotein Alkalische Phosphatase (ALP, codiert durch *PHO8*) wird unabhängig von den Klasse E Genen *VPS27* und *VPS4* vorbei am Endosom zur Vakuole transportiert. Der N-terminale cytosolische Teil der ALP ist notwendig und ausreichend für diesen Transport [18] [19]. In der Hefe *S. cerevisiae* sind drei heterotetramere Adapterproteinkomplexe (AP) beschrieben [8]. AP-1 und AP-2 sind an der Bildung Clathrin-bedeckter Vesikel im endosomalen Transport beteiligt [20]. Der AP-3 Komplex ist nicht mit Clathrin assoziiert und ist für den direkten Transport der Alkalischen Phosphatase vom Golgi-Apparat zur Vakuole nötig [21], [22], [23].

2.3 Fusion mit der Vakuolenmembran

Der Transport von Proteinen im sekretorischen Weg erfordert die Bildung von Vesikeln und ihre spezifische Fusion mit den Zielmembranen. Als eine wichtige Komponente wurde zunächst der zur Familie der AAA-Typ ATPasen gehörende N-Ethylmaleimid-sensitive Faktor (NSF) charakterisiert [24]. In Hefe handelt es sich dabei um Sec18p [25]. Clary *et al.* identifizierten den α -SNAP (soluble NSF association protein) als Bindungspartner [26]. Das Ortholog in Hefe ist Sec17p [27]. Söllner *et al.* konnten schließlich die membrangebundenen SNAREs (soluble NSF attachment protein receptor) nachweisen [28]. SNARE-Proteine sind eine Protein-

Superfamilie, die sich durch ein konserviertes, 60-70 Aminosäuren umfassendes SNARE-Motiv auszeichnen und meist über ihren C-Terminus in der Membran verankert sind [29]. Die SNARE-Hypothese besagt, dass ein Transportvesikel durch ein Vesikel (v)-SNARE und die Zielmembran durch drei Target (t)-SNAREs gekennzeichnet ist [30]. Alternativ werden sie, je nach Vorkommen von Arginin oder Glutamin im SNARE-Motiv, auch als R- und Q-SNAREs bezeichnet [31], [32]. Sie bilden für die Membranfusion einen stabilen SNARE-Komplex, bestehend aus einem Bündel von vier Helices.

Sec1/Munc18 (SM) Proteine sind hydrophile Proteine mit einer Größe von 60-70 kDa und moderater Sequenzhomologie [33], [34]. Sie stabilisieren die SNAREs im Verlauf der Membranfusion.

Nachfolgend wird am Beispiel der homotypischen Vakuolenfusion der Ablauf der Membranfusion unter der Beteiligung der SNAREs, NSF und α -SNAP erläutert.

2.3.1 Homotypische Vakuolenfusion

Vakuolen von *S. cerevisiae* stellen geeignete Modellsysteme dar, um die Annäherung von Membranen und ihre anschließende Fusion zu untersuchen. Die Fusion isolierter Vakuolen lässt sich *in vitro* messen [35] [36]. Die Vakuolenfusion gliedert sich in mehrere Abschnitte.

Während des ATP-abhängigen *Primings* werden die *cis*-SNARE-Komplexe durch die Aktivität von Sec18p und Sec17p getrennt [37]. Für die Vakuolenfusion wurden fünf mögliche SNAREs identifiziert: drei Q-SNAREs (Vam3p, Vam7p und Vti1p) und zwei mögliche R-SNAREs (Ykt6p oder Nyv1p) [38]. Die drei Q-SNAREs bilden dabei entweder Komplexe mit Ykt6p oder mit Nyv1p [39], [40]. Es wird angenommen, dass der Nyv1p-Komplex vor allem für die Vakuolenfusion benötigt wird. Der Ykt6p-Komplex hingegen soll in anderen Fusionsprozessen an der Vakuole sowie an Palmitoylierung von Proteinen beteiligt sein [41], [42].

Vam7p besitzt als SNAP-25 Homolog keine Transmembrandomäne und bindet über seine N-terminale PX-Domäne über PtdIns(3)P an die Membran [43] [44]. Vam3p wird im *cis*-SNARE-Komplex durch die Sec18p-abhängige Bindung von LMA1 stabilisiert. LMA1 ist ein Komplex aus dem Proteinase B-Inhibitor Pbi2p und Thioredoxin [45].

Im anschließenden *Tethering* nähern sich die zu fusionierenden Membranen an. Die Annäherung erfordert die Aktivität einer RabGTPase, im Falle der homotypischen Vakuolenfusion handelt es sich dabei um Ypt7p. Außerdem wird die Spezifizierung der Membranfusion durch *Tethering Komplexe* gewährleistet, welche die zu fusionierenden Membranen verbinden [46]. An der Vakuolenfusion ist der HOPS-Komplex (homotypic vacuole fusion and protein sorting; Vps Klasse C Proteine) beteiligt [43]. Dazu gehören Vps11p, Vps16p, Vps18p, Vps33p, Vps39p und Vps41p. Vps33p ist Sec1p-ähnliches SNARE-bindendes Protein [47]. Vps39p ist der Guaninnucleotid-Austauschfaktor für Ypt7p [48]. Der HOPS-Komplex bindet an Ypt7p und an die SNAREs [47]. Peplowska *et al.* beschreiben einen endosomalen *Tethering Komplex* (CORVET), der ebenfalls Vps11p, Vps16p, Vps18p sowie Vps33p enthält [49]. Zusätzlich finden sich in diesem Komplex noch Vps8p und Vps3p. Dieser Komplex interagiert mit dem SNARE-Protein Pep12p.

Die für die *Fusion* benötigten Proteine und Lipide wie PtdIns(4,5)P₂, Diacylglycerol oder Ergosterol [50] [51] finden sich vor allem in einer als Vertex bezeichneten ringförmigen Mikrodomäne [52] [53]. Die SNAREs aus gegenüberliegenden Membranen bilden *trans*-SNARE-Komplexe [54]. Dabei wird LMA1 von Vam3p freigesetzt. An der Reaktion ist Vtc3p, eine Komponente aus dem VTC-Komplex (vacuole transporter chaperone) beteiligt [55].

Schließlich fusionieren die Membranen entlang des Vertexringes, die entstehende Membranscheibe wird von der Vakuole internalisiert [56]. Der *trans*-SNARE-Komplex wird in der fusionierten Membran wieder zu einem *cis*-SNARE-Komplex und muss vor der nächsten Fusion durch die Aktivität des NSF erneut in eine reaktionsfähige Konformation überführt werden.

Einige der an der Vakuolenfusion beteiligten Proteine werden palmitoyliert, darunter auch Vac8p [57]. Weiterhin sind Calciumionen und Calmodulin für die Vakuolenfusion notwendig [58]. Das Aktin-Cytoskelett scheint an der Vakuolenfusion beteiligt zu sein [59]. Die Beteiligung der V-ATPase an der Vakuolenfusion wird kontrovers diskutiert. Es wird vorgeschlagen, dass die V₀-Untereinheiten Poren zwischen den zu fusionierenden Membranen bilden, die Funktion als Protonenpumpe scheint jedoch nicht notwendig zu sein [60] [61]. Die Bedeutung dieser Hypothese in Bezug zur anerkannten Rolle der SNAREs ist unklar.

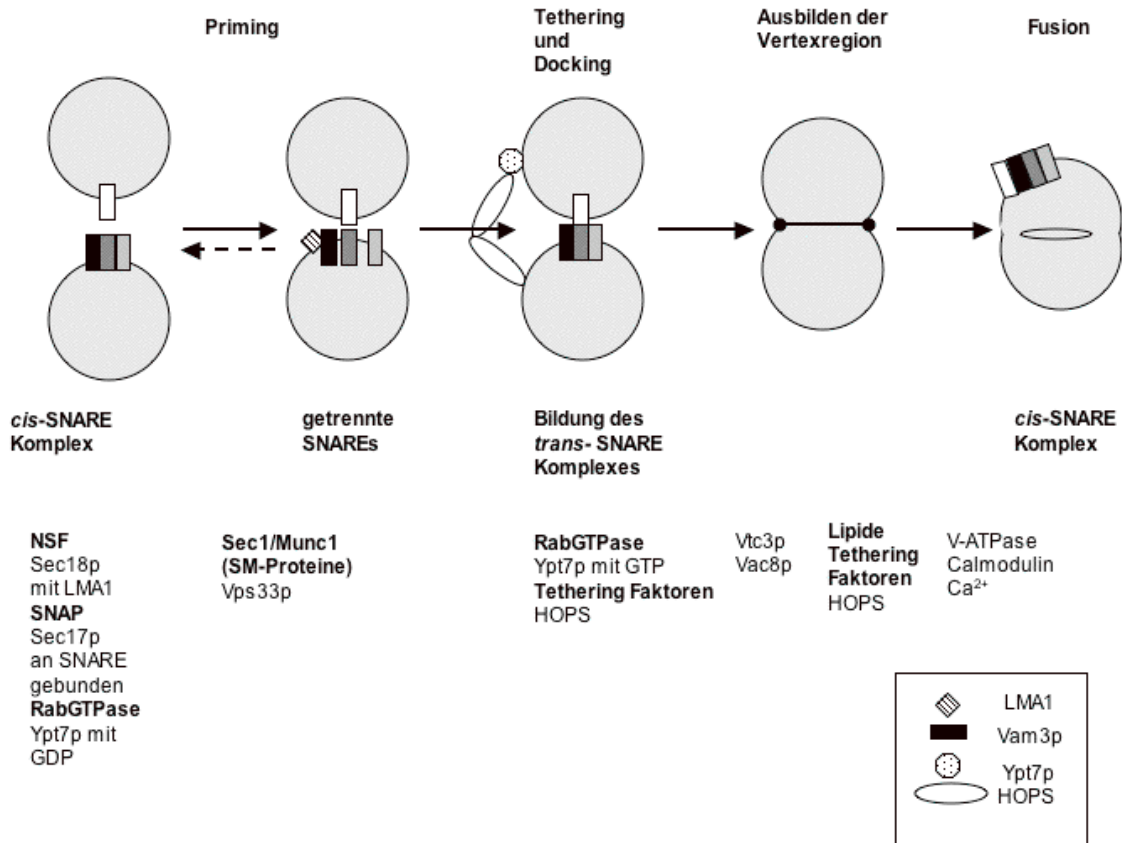


Abbildung 2.2: Homotypische Vakuolenfusion. Gezeigt werden die Verteilung der SNAREs in den verschiedenen Abschnitten des Fusionsprozesses sowie die jeweils beteiligten Proteine. Modifiziert nach [62] und [63]

2.4 Cvt-Weg und Autophagie

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Transportwegen vakuolärer Proteine wird die Aminopeptidase I (Ape1p, codiert durch *APE1*) unabhängig vom sekretorischen Weg zur Vakuole transportiert. Ape1p wird als eine inaktive Proform (61 kDa) im Cytosol synthetisiert und in der Vakuole *PEP4*-abhängig gereift (50 kDa) [64]. Der Transport zur Vakuole wird als Cvt-Weg (cytosol to vacuole targeting) bezeichnet. Dabei werden im Cytosol proApe1p-Monomere zu einem Homododekamer und schließlich zu einem oligomeren Ape1p-Komplex zusammengelagert [65] [66]. Der Komplex wird in doppelmembranlagige Vesikel (Durchmesser etwa 150 nm) verpackt, deren äußere Membran mit der Vakuolenmembran fusioniert. Der innere Vesikel wird in der Vakuole lysiert und die

proApe1p proteolytisch gereift [67] [68]. Unter Wachstumsbedingungen wird neben der proApe1p auch α -Mannosidase (Ams1p) über den Cvt-Weg transportiert [69].

Bei Hungerbedingungen erfolgt der Transport der proApe1p über Autophagie. Viele der am Cvt-Weg beteiligten Gene sind auch für die Autophagie notwendig [70] [67]. Die an beiden Prozessen beteiligten Gene werden als *ATG*-Gene bezeichnet [71]. In Abbildung 2.3 sind der Cvt-Weg und die verschiedenen Formen der Autophagie dargestellt.

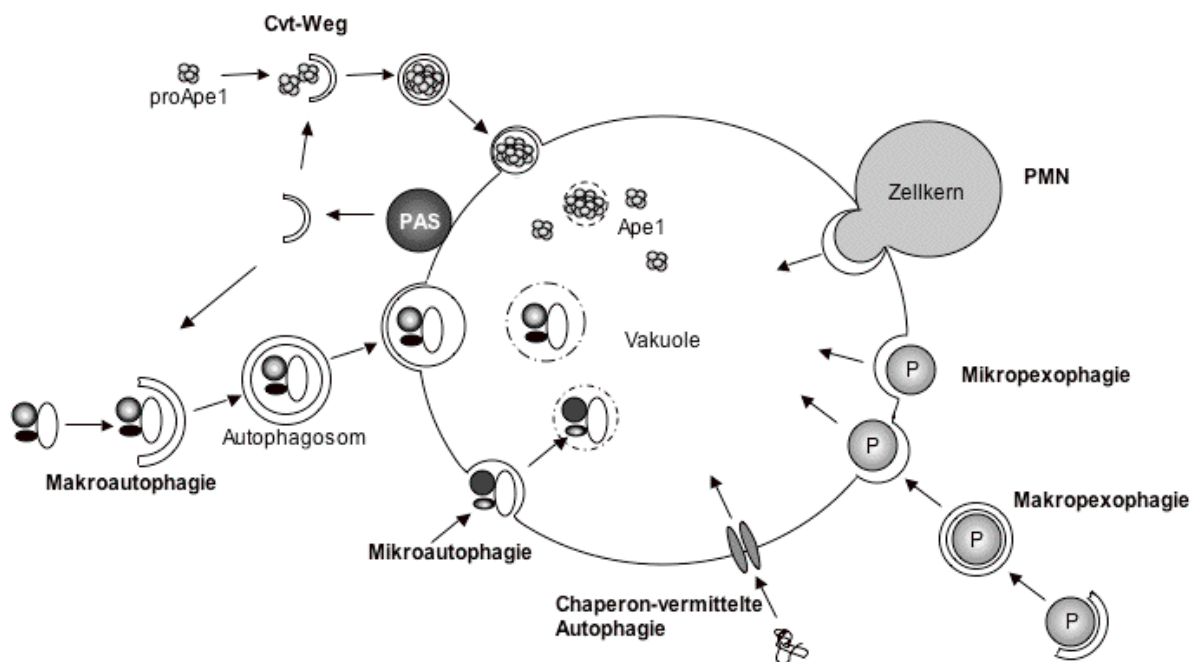


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung verschiedener Formen der Autophagie. Gezeigt sind neben der Chaperon-vermittelten Autophagie die verschiedenen Formen der Makro- und Mikroautophagie. PMN ist ein mikroautophagischer Prozess, der den selektiven Abbau von Substraten erlaubt. Ferner ist der Cvt-Weg als spezifische Form der Autophagie gezeigt. **Cvt** cytoplasm to vacuole targeting; **P** Peroxisom; **PAS** Präautophagosomale Struktur; **Ape1p** Aminopeptidase 1; **PMN** piecemeal microautophagy of the nucleus. Modifiziert nach [72].

Während der Autophagie werden ganz unterschiedliche Substrate wie individuelle Proteine, Cytoplasma oder auch Organellen zum Abbau in das Lysosom oder die Vakuole transportiert. So können den Zellen wieder Aminosäuren oder Lipidbausteine zur Verfügung gestellt werden [1]. Zahlreiche Arbeiten zeigten, dass Autophagie den Zellen ein Überleben bei Nährstoffmangel ermöglicht. Darüber hinaus ist bekannt, dass Autophagie an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Dazu gehört zum Beispiel die Regulation der Anzahl von Organellen in der Zelle [73],

Regulation des Zelltodes [74], verschiedene Entwicklungsprozesse [75] und die Lebensdauer von Zellen [76]. Autophagie spielt außerdem für viele Krankheiten beim Menschen eine Rolle [77], z.B. bei Krebs [78] [79], Cardiomyopathie [80] und bei neurodegenerativen Störungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington [81]. Autophagie ist ein ubiquitärer Prozess, der in allen eukaryotischen Zellen stattfindet [82] [83]. Man unterscheidet drei Formen der Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie. Die Chaperon-vermittelte Autophagie ist eine sekundäre Antwort auf Nährstoffmangel und führt, im Gegensatz zu den anderen beiden Prozessen zu einer direkten Translokation der transportierten Proteine durch die lysosomale Membran mittels eines Proteinkanals [84].

2.4.1 Makroautophagie

Die durch Nährstoffmangel induzierte Makroautophagie führt zur cytoplasmatischen Bildung von 300-900 nm großen Vesikeln, die von einer Doppelmembran umgeben sind (Autophagosomen) und während ihrer Bildung unspezifisch Teile des Cytosols oder Zellorganellen einhüllen. [85]. Sie fusionieren schließlich mit der Vakuole und entlassen ein autophagisches Vesikel in das Lumen. Der Transportweg lässt sich in verschiedene Abschnitte gliedern.

Die Induktion der Autophagie und des Cvt-Wegs wird in *S. cerevisiae* im Wesentlichen über den Atg1p-Atg13p-Komplex und die Tor-Kinase (Target of Rapamycin) reguliert. Nährstoffmangel führt zur Inhibierung der Tor-Kinase, zur partiellen Dephosphorylierung von Atg13p und zu einer verstärkten Wechselwirkung mit Atg1p. Die daraus resultierende erhöhte Kinaseaktivität führt zur Induktion der Autophagie [86] [87]. Atg1p interagiert unter anderem auch mit Atg17p und Atg11p. Atg17p ist spezifisch für die Autophagie [88], Atg11p wird nur für den Cvt-Weg benötigt [89]. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Atg1p-Atg13p-Komplex eine Art Schalter zwischen der Autophagie und dem Cvt-Weg darstellt.

Die Auswahl des im Autophagosom zu transportierenden Inhalts erfolgt im Falle der Autophagie weitgehend unspezifisch [85]. Die proApe1p wird nach Bindung durch dem Rezeptor Atg19 selektiv in die Membran verpackt [90].

Die Vesikelbildung erfolgt ausgehend von einem Organisationszentrum, das als präautophagosomale Struktur [91] bezeichnet wird [85]. Viele an der Autophagie

beteiligte Proteine können zumindest vorübergehend an dieser Struktur lokalisiert werden. Die Entstehung des PAS und der Ursprung der Autophagosomen-Membran sind trotz zahlreicher Untersuchungen nicht eindeutig geklärt [92].

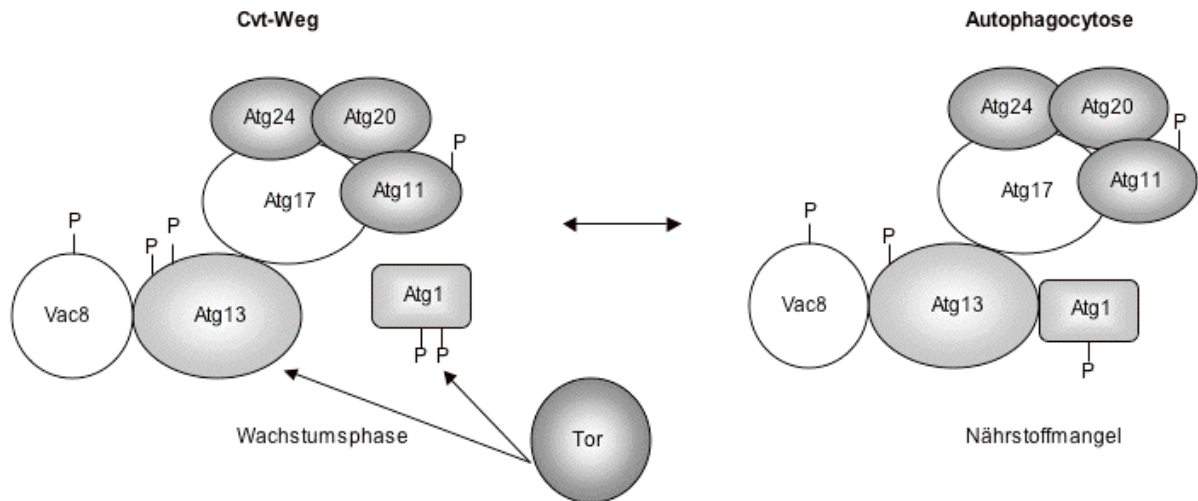


Abbildung 2.4: Die Regulation der Induktion. Modifiziert nach [85].

In Hefe gibt es nur eine einzige Phosphatidylinositol 3-Kinase, Vps34p. Sie wirkt in zwei funktionell unterschiedlichen Komplexen [93].

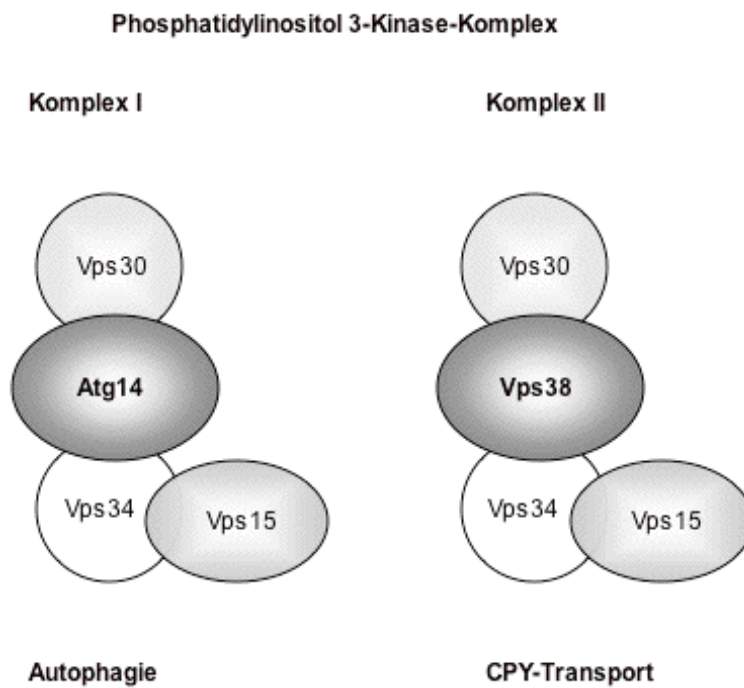


Abbildung 2.5: Vps34-Komplexe in Hefe

Der eine Komplex ist für den Transport der Carboxypeptidase Y (CPY) vom Golgi zur Vakuole notwendig. Der andere Komplex enthält spezifisch Atg14p ist am PAS lokalisiert und ist wesentlich für Autophagie und den Cvt-Weg. Einige der an der Autophagie beteiligten Proteine binden am PAS über PtdIns(3)P.

An der Vesikelbildung sind ferner zwei Ubiquitin-ähnliche Proteine Atg8p und Atg12p beteiligt. Der C-terminale Arginin-Rest von Atg8p wird von der Cystein-Protease Atg4p abgespalten und ein Glycin-Rest wird frei [94]. Atg8p und Atg12p werden von dem E1-ähnlichen Enzym Atg7p aktiviert und auf die E2-ähnlichen Enzyme Atg3p bzw. Atg10p übertragen [95] [96]. Atg8p wird dann an Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppelt; Atg12p an Atg5p. Das Atg8-PE wird in der Membran am PAS verankert und ist an der Bildung der Autophagosomen direkt beteiligt. Atg8p ist das einzige bekannte hungerinduzierte Atg-Protein [97]. Fehlt Atg8p bei der Vesikelbildung während der Autophagie, kommt es zur Bildung ungewöhnlich kleiner Autophagosomen [98]. Atg12p und Atg5p binden nicht-kovalent an Atg16p. Über Atg16p kann ein multimerer Komplex gebildet werden [99], der möglicherweise als transiente Hülle dient [85]. Eine zweite Spaltung durch Atg4p entfernt Atg8p von der äußeren Membran des fertigen Vesikels.

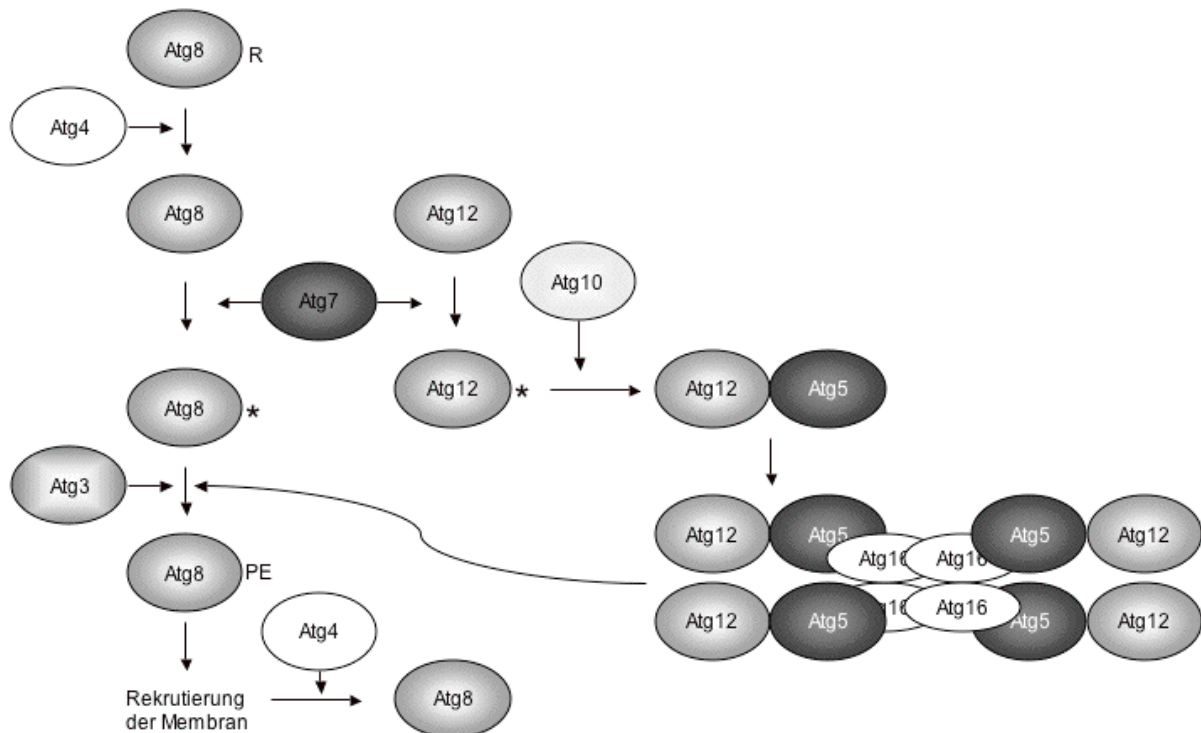


Abbildung 2.6: Zwei Ubiquitin-ähnliche Proteinkonjugationssysteme in der Autophagie. Modifiziert nach [85]

Das an die innere Membran des Vesikels gebundene Atg8p gelangt in die Vakuole und wird dort mit dem Inhalt des Vesikels abgebaut.

Etwa 20 der 30 beschriebenen Atg-Proteine lokalisieren am PAS und finden sich nicht an den fertigen Vesikeln. Dies gilt auch für das einzige beschriebene Transmembranprotein der Autophagie, Atg9p [100] [101]. Es findet also auch ein Recycling am PAS oder bei der Bildung der Autophagosomen und der Cvt-Vesikel statt. Für das Atg9p-Recycling zu einem angeblichen Mitochondrien-Pool werden Atg18p, Atg2p, Atg13p und Atg1p benötigt [102].

Für die Fusion der äußeren Vesikelmembran mit der Vakuole sind die Proteine der homotypischen Vakuolenfusion notwendig. Der Abbau des autophagischen Vesikels und seines Inhalts in der Vakuole ist abhängig vom sauren pH-Wert im Lumen der Vakuole und von Proteinase A und B [103]. Zwei weitere an der Lyse beteiligte Proteine sind Atg22p, ein integrales Membranprotein, das als Permease dient und Atg15p [104, 105], [106] [107].

2.4.1.2 Die putative Lipase Atg15p

ATG15 wurde gemeinsam mit anderen Autophagie-relevanten Mutanten nach EMS-Mutagenese und einem Screen nach Deletionsstämmen, die Autophagie-Defekte aufweisen, identifiziert [108], [70]. Atg15p ist ein 58 kDa großes, integrales Membranprotein und besteht aus 520 Aminosäuren. Das Protein enthält drei Glykosilierungsstellen. Es ist an der Lyse der Autophagosomen in der Vakuole beteiligt. Eine Deletion von *ATG15* führt in der Hefe *S. cerevisiae* bei Nährstoffmangel zu einem Defekt in der Reifung von proApe1p und zur Akkumulation von autophagischen Vesikeln in der Vakuole. Atg15p enthält ein Motiv, das in Esterasen und Lipasen konserviert ist. Das Lipase-Motiv mit einem aktiven Serin in Position 332 ist notwendig für die lytische Funktion des Proteins und vermutlich Teil einer katalytischen Triade. Das Membranprotein besitzt mindestens eine Transmembrandomäne. Darauf folgen weitere hydrophobe Bereiche, die bisher nicht als eindeutige Transmembranregionen identifiziert werden konnten. Der Aminoterminus ist im Cytosol lokalisiert und der Carboxyterminus im ER-Lumen. Atg15p enthält drei Glykosilierungsstellen. Das Protein wird im ER synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und erreicht die Vakuole über einen von der Autophagie

unabhängigen Transportweg. Der Transport von Atg15p ist abhängig von Vps-Proteinen der Klasse E und erfolgt über den MVB-Weg. Mit Immunogold-Markierungen konnte das Protein am ER und an 50 nm großen, intravakuolären MVB-Vesikeln gezeigt werden. Der Transport wird wie der von Sna3p als Ubiquitin-unabhängig beschrieben, eine Deletion von *DOA4* oder *TUL1* beeinflusst den Transport nicht [107, 109].

2.4.2 Mikroautophagie

Mikroautophagische Prozesse zeichnen sich durch eine direkte Einstülpung der Vakuolen- oder Lysosomenmembran aus. Dies führt zur Ausbildung von Vesikeln, die von der Vakuolenmembran umgeben sind [110].

Über Autophagie können ganze Organellen abgebaut werden [111]. So variiert die Anzahl der Peroxisomen pro Zelle in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und Nährstoffangebot [112]. Auch für den autophagischen Abbau von Peroxisomen sind zwei Arten beschrieben: Makro- und Mikropexophagie [113] [111].

2.4.2.1 Mikropexophagie

Pexophagie ist vor allem in den methylotrophen Hefen *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris* näher untersucht. Viele der in *S. cerevisiae* bekannten *ATG*-Gene sind auch an der Pexophagie beteiligt [114], [1].

Während der Mikropexophagie kommt es zur Bildung von Einstülpungen der Vakuolenmembran und zur Abschnürung von Vesikeln, die einen Zusammenschluss von mehreren Peroxisomen einhüllen. Im weiteren Verlauf bildet sich eine transiente, doppelmembranlagige Struktur, die als MIPA (micropexophagy-specific membrane apparatus) bezeichnet wird [115]. Nachdem die Peroxisomen vollständig von der Membran eingehüllt sind, gelangen sie in einem Vesikel in die Vakuole und werden dort abgebaut.

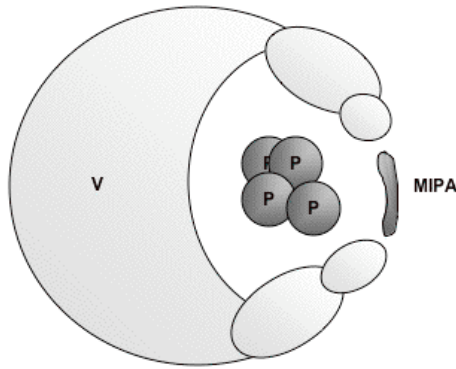


Abbildung 2.7: Lokalisierung des MIPA während der Mikropexophagie. Das MIPA befindet sich gegenüber der Einstülpung der Vakuolenmembran. Vakuole (V); Peroxisom (P); modifiziert nach [1].

In Tabelle 2.1 sind die an der Pexophagie in *P. pastoris* beteiligten Gene aufgeführt.

Tabelle 2.1: An der Pexophagie in *P. pastoris* beteiligte Gene. Mit einem * markierte Gene sind ausschließlich an der Mikropexophagie beteiligt. Nach [116] und [1].

Pexophagie-Gene	
<i>ATG1</i>	<i>ATG26*</i>
<i>ATG2</i>	<i>ATG28</i>
<i>ATG3</i>	<i>GCN1*</i>
<i>ATG4</i>	<i>GCN2*</i>
<i>ATG7</i>	<i>GCN3*</i>
<i>ATG8</i>	<i>GCN4</i>
<i>ATG9</i>	<i>PEP4</i>
<i>ATG11</i>	<i>PFK1*</i>
<i>ATG16</i>	<i>TRS85</i>
<i>ATG18</i>	<i>VAC8</i>
<i>ATG21</i>	<i>VPS15</i>
<i>ATG24</i>	<i>VPS34</i>
<i>ATG25</i>	

In der Hefe *S. cerevisiae* wird Pexophagie durch Umsetzen der Zellen von einem Ölsäure-haltigen Medium auf ein glukosehaltiges Medium ohne Stickstoffquelle ausgelöst. Es ist unklar ob dabei Makro- oder Mikropexophagie induziert wird. An beiden Prozessen sind die meisten der *ATG*-Gene beteiligt [117].

2.5 Mikroautophagischer Abbau des Zellkerns und von Teilen des Kern-ER–„piecemeal microautophagy of the nucleus“

Die Kernhülle ist von zwei konzentrischen Membranen umgeben, die Subdomänen des ER darstellen. Die äußere Membran bildet ein Kontinuum mit dem rauen ER, die innere Membran enthält Bindestellen für Chromatin. Über die Kernporen sind innere und äußere Membran miteinander verbunden. In der Hefe *S. cerevisiae* ist die Kernhülle über Kontaktstellen mit der Vakuolenmembran assoziiert (NV-junction). In diesem Bereich finden sich keine Kernporen [118], [119]. Die Ausbildung dieser Kontaktstellen beruht auf der molekularen Interaktion von Nvj1p in der äußeren Kernmembran und Vac8p in der Vakuolenmembran.

Während PMN (piecemeal microautophagy of the nucleus) werden Teile des Kern-ERs und des Nucleolus zur Vakuole transportiert und abgebaut. PMN beginnt mit der Ausbildung der Kontaktstellen zwischen Kern-ER und Vakuole. Es kommt zu einer Invagination der Vakuolenmembran und zum Einhüllen von Vesikeln, die sich am ER bilden. Die entstehenden dreilagigen Vesikel werden in der Vakuole abgebaut [119]. Abbildung 2.8 zeigt den schematischen Ablauf von PMN.

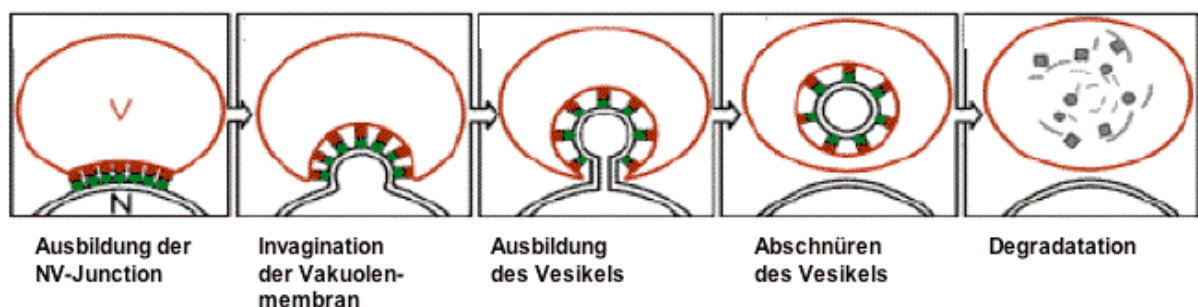


Abbildung 2.8: Morphologisch unterscheidbare Stufen während PMN in Hefe. Modifiziert nach [119].

Der Promotor von Nvj1p enthält zwei durch Stress induzierbare Elemente [120]. Basierend auf der Sequenzhomologie in der *Saccharomyces*-Familie kann Nvj1p in vier Domänen eingeteilt werden [121]. Nvj1p bildet eine Plattform in der äußeren Kernmembran, über die weitere Bindungspartner rekrutiert werden. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein molekulares Modell der Kontaktstelle von Kern-ER und Vakuolenmembran.

Der hydrophobe N-Terminus von Nvj1p (I) verbindet die innere und die äußere Kernmembran entweder durch die direkte Bindung (Abbildung 2.9 B) in der inneren Membran oder durch die Wechselwirkung mit einem bisher unbekanntem Faktor (X) in der inneren Membran (Abbildung 2.9 A). Diese Verankerung in der Membran ermöglicht nach Kvam und Goldfarb die Ausbildung eines Vesikels, an dem beide Kernmembranen beteiligt sind [121]. Tsc13p interagiert mit einer die ER-Membran durchspannenden Domäne [122]. Eine anschließende cytosolische Region ist mit Osh1p assoziiert (III). Der C-Terminus ist im Cytoplasma lokalisiert und bindet Vac8p [123] in der Vakuolenmembran (IV) [121].

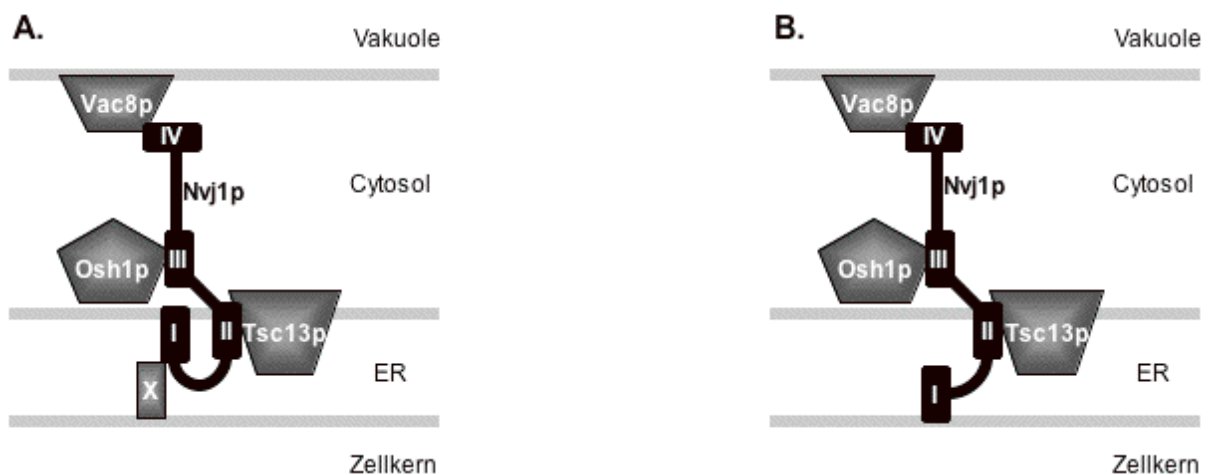


Abbildung 2.9: Modell der Kontaktregion zwischen Kern-ER und Vakuolenmembran. Erläuterung im Text. Modifiziert nach [121].

Vac8p ist, ähnlich wie β -Catenin oder Importin- α , gekennzeichnet durch Armadillo-Wiederholungen, die eine Basis für die Bindung von Proteinen in Multiproteinkomplexen bilden. Das Protein bindet über Palmitoylierung und eine Myristoylgruppe in der Vakuolenmembran [57] [118]. Vac8p ist an verschiedenen Prozessen an der Vakuolenmembran beteiligt. Es wurde ursprünglich als ein Protein identifiziert, das für die Vakuolenvererbung notwendig ist [118]. Zudem bildet es Cluster an Kontaktstellen zwischen Vakuolen [123]. Wie bereits erwähnt, ist es an der Fusion von Vakuolen [124] sowie am Cvt-Weg beteiligt; Makroautophagie ist in VAC8-defizienten Zellen reduziert [125] [102].

In den Kontaktstellen zwischen ER und Vakuole akkumulieren auch Proteine, die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Dazu gehört Tsc13p, eine Enoyl-CoA Reduktase in der ER-Membran, die an der Synthese von sehr langen Fettsäureketten (VLCFA; very long chain fatty acids) beteiligt ist. Diese finden sich unter anderem in

Sphingolipiden [126]. Es wird angenommen, dass diese Fettsäuren die Ausbildung von stark gekrümmten Membranstrukturen ähnlich der Membraninvagination während PMN unterstützen [127]. Tsc13p bindet an Nvj1p [128]. Ein weiteres Protein an den Kontaktstellen ist Osh1p. Es gehört zu einer Proteinfamilie in Hefe (Osh1p-Osh7p), die homolog zu den Oxysterol-bindenden Proteinen (OSBP) in Säugerzellen ist. In Hefe sind sie am Lipidtransport und an der Signaltransduktion beteiligt [129]. Die Osh-Proteinfamilie in Hefe ist durch eine konservierte Oxysterol-bindende Domäne gekennzeichnet. Osh1p besitzt zusätzliche Motive, die eine duale Lokalisierung des Proteins ermöglichen. Die Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne führt zur Lokalisierung am Golgi-Apparat, die Ankyrin-Motive führen bei Nährstoffmangel zur Lokalisierung an den Kontaktstellen zwischen Kern-ER und Vakuole [130].

Sowohl Tsc13p als auch Osh1p werden in der stationären Wachstumsphase verstärkt in die Kontaktregion zwischen Kern-ER und Vakuole rekrutiert [126] [130]. Es wird angenommen, dass diese Proteine die Lipidzusammensetzung während PMN modifizieren [131].

PMN wird wie ein autophagischer Prozess durch Stickstoff- oder Glukosemangel sowie durch Rapamycin induziert [119]. Ferner wurde die Akkumulation von PMN-Vesikeln in *PEP4*-defizienten Stämmen beschrieben [119]. PMN wurde bisher nur in der Arbeitsgruppe von D. S. Goldfarb untersucht. Hier kam man zu dem Schluss, dass PMN nicht direkt von der Autophagiemaschinerie abhängig ist. Die Beteiligung weiterer Atg-Proteine wurde bisher nicht untersucht.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, im Modellorganismus *S. cerevisiae* Proteine zu identifizieren, die am mikroautophagischen Abbau von Teilen des Zellkerns und der Kernmembran durch PMN beteiligt sind. Eine Beteiligung der Genprodukte sollte dabei indirekt über den Abbau von GFP-Osh1p in den entsprechenden Deletionsmutanten untersucht werden. GFP-Osh1 wird durch die Induktion der Autophagie an die Kontaktstellen zwischen Vakuolenmembran und

Kern-ER rekrutiert und gelangt zusammen mit den gebildeten PMN-Vesikeln in die Vakuole. Dort wird das Fusionsprotein schließlich proteolytisch abgebaut. Das dabei entstehende freie GFP ist relativ stabil und kann mittels Western Blot detektiert werden. Kann in einer Deletionsmutante freies GFP nachgewiesen werden, ist das entsprechende Protein nicht für PMN notwendig.

Folgende Fragestellungen sollten erarbeitet werden:

- Welche der bisher bekannten ATG-Gene sind an PMN beteiligt?
- Sind auch Proteine an PMN beteiligt, die für den Cvt-Weg spezifisch sind?
- Werden für PMN Derivate des Phosphatidylinositols benötigt?
- Spielen die Komponenten der homotypischen Vakuolenfusion eine Rolle während PMN?
- Ist PMN mit der in *S. cerevisiae* beschriebenen Mikroautophagie und der für *P. pastoris* beschriebenen Mikropexophagie vergleichbar?

Ein weiterer Schwerpunkt in dieser Arbeit sollte auf Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des lytischen Enzyms Atg15p liegen.

- Mit Hilfe von N- und C-terminalen GFP-Fusionen sollten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisierung des Atg15p durchgeführt werden. Weiterhin sollten C-terminal trunkierte Versionen von GFP-Atg15p erzeugt und ihre Aktivität untersucht werden.
- Es sollte untersucht werden, ob die Aktivität von Atg15p vom Transport über die MVB-Vesikel abhängt. Dazu sollte ein Fusionsprotein aus der cytosolischen Domäne und der Transmembrandomäne der Alkalischen Phosphatase und Atg15p ohne Transmembrandomäne in Wachstumstests untersucht werden (ALP-Atg15p). Ausgehend von dem Fusionsprotein sollte durch Austausch des Serins im aktiven Zentrum von Atg15p gegen Alanin ein inaktives Fusionskonstrukt erzeugt werden. Auch dieses biologisch inaktive Konstrukt sollte in Wachstumstests untersucht werden.
- Durch Untersuchungen einer möglichen Ubiquitinierung von Atg15p und Sna3p sollte der Transport beider Proteine im MVB-Weg näher untersucht werden. Durch Mutagenese eines PxY-Motivs in Atg15p sollte dessen mögliche Funktion für den Transport von Atg15p ermittelt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Sämtliche Hefestämme, die für diese Arbeit verwendet wurden, sowie daraus hergestellte neue Stämme, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit eingesetzte *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>atg8</i> Δ	WCG4a MATα <i>atg8::KAN</i>	AG Thumm
BY 4741	MATa <i>his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ0 <i>met15</i> Δ0 <i>ura3</i> Δ0	Euroscarf
BY4743	MATa/MATα MET15/Δ <i>met15</i> LYS/Δ <i>lys2</i> Δ <i>ura3</i> /Δ <i>ura3</i> Δ <i>leu2</i> /Δ <i>leu2</i> <i>his3-1</i> / <i>his3-1</i>	Euroscarf
MHY501	MATα <i>ura3-52 leu2-3,112 his3 lys2 trp1 GAL</i>	Hochstrasser, 1999 [132]
MHY623	MATα <i>doa4</i> Δ:: <i>LEU2</i>	Hochstrasser, 1999 [132]
MHY834	MATα <i>doa4</i> Δ:: <i>LEU2 pep4</i> Δ:: <i>HIS3</i>	Hochstrasser, 1999 [132]
<i>pep4</i> Δ	WCG4a MATα <i>pep4::KAN</i>	H. Barth
RSY255	RSY255 MATα	C. Kaiser
RSY269	RSY269 MATα <i>sec17-1</i>	C. Kaiser
RSY272	RSY272 MATα <i>sec18-1</i>	C. Kaiser
WCG4a	WCG4a MATα <i>his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i>	W. Heinemeyer, Stuttgart
Y00212	BY4741 MATa <i>vtc1</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y00249	BY4741 MATa <i>gcn4</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y00560	BY4741 MATa <i>ubx2</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y00742	BY4741 MATa <i>atg16</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y00817	BY4741 MATa <i>vps11</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y01375	BY4741 MATa <i>ubx6</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y01386	BY4741 MATa <i>atg24</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y01530	BY4741 MATa <i>atg10</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y01709	BY4741 MATa <i>tlg2</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y01970	BY4741 MATa <i>atg2</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y01989	BY4741 MATa <i>atg4</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y02086	BY4741 MATa <i>atg29</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf
Y02103	BY4741 MATa <i>atg5</i> Δ:: <i>KAN</i>	Euroscarf

Y02132	<i>BY4741 MATa atg6Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y02362	<i>BY4741 MATa vam3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y02704	<i>BY4741 MATa nyv1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y02809	<i>BY4741 MATa vtc3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03084	<i>BY4741 MATa shp1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03214	<i>BY4741 MATa ego3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03266	<i>BY4741 MATa vma2Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03267	<i>BY4741 MATa atg14Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03357	<i>BY4741 MATa atg12Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03689	<i>BY4741 MATa ubx5Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03774	<i>BY4741 MATa vps39Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03788	<i>BY4741 MATa ubx3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03810	<i>BY4741 MATa atg20Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y03961	<i>BY4741 MATa atg31Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04004	<i>BY4741 MATa doa4Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04015	<i>BY4741 MATa vps41Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04042	<i>BY4741 MATa trs85Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04138	<i>BY4741 MATa ugt51Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04318	<i>BY4741 MATa vps52Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04462	<i>BY4741 MATa vps45Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04547	<i>BY4741 MATa atg1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04562	<i>BY4741 MATa gcn1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04578	<i>BY4741 MATa vam7Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y04793	<i>BY4741 MATa gtr2Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05078	<i>BY4741 MATa ego1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05091	<i>BY4741 MATa vps51Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05097	<i>BY4741 MATa gcn3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05269	<i>BY4741 MATa vps38Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05305	<i>BY4741 MATa vps33Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05343	<i>BY4741 MATa pbi2Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05382	<i>BY4741 MATa atg3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05600	<i>BY4741 MATa atg13Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05721	<i>BY4741 MATa ubx7Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05789	<i>BY4741 MATa atg15Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05886	<i>BY4741 MATa hsv2Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y05893	<i>BY4741 MATa pfk1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y06026	<i>BY4741 MATa atg17Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y06034	<i>BY4741 MATa atg23Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y06188	<i>BY4741 MATa stv1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y06200	<i>BY4741 MATa ubx4Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y06780	<i>BY4741 MATa vtc4Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y06797	<i>BY4741 MATa vps53Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y07080	<i>BY4741 MATa fab1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y07174	<i>BY4741 MATa apm3Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y07328	<i>BY4741 MATa vph1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y23248	<i>BY4743 MATa/α cmd1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y24302	<i>BY4743 MATa/α tlg1Δ::KAN</i>	Euroscarf
Y35789	<i>BY4743 MATa atg15Δ::KAN/atg15Δ::KAN</i>	Euroscarf
YCV6	<i>WCG4a MATa gcn4::KAN</i>	C. Voss
YCV8	<i>WCG4a MATa gcn2::KAN</i>	C. Voss
YHB1	<i>WCG4a MATa atg18::KAN</i>	H. Barth

YHB4	WCG4a MAT α atg21::KAN	H. Barth
YHB7	WCG4a MAT α ypt7::KAN	H. Barth
YIS4	WCG4a MAT α atg15::KAN	U. Epple
YIS8	WCG4a MAT α atg15 Δ ::KAN pep4 Δ ::HIS3	U. Epple
YMS30K1	WCG4a MAT α atg1::KAN	AG Thumm
YO2371	BY4741 MAT α trs33 Δ ::KAN	Euroscarf
YSR2	WCG4a MAT α atg9::KAN	S. Reiche
YUE29	WCG4a MAT α pep4 Δ ::KAN aut1::ADE2	U. Epple
YUE34	WCG4a MAT α atg3 Δ ::ADE2	U. Epple
YUE40	WCG4a MAT α atg1 Δ ::KAN pep4 Δ ::HIS3	U. Epple
YUE47	WCG4a MAT α atg19::KAN	U. Epple
YUE50	WCG4a MAT α atg22::KAN	U. Epple
YUE59	WCG4a MAT α prb1::KAN	U. Epple
YYW07	WCG4a MAT α atg7::HIS3	diese Arbeit
YYW08	WCG4a MAT α nvj1::HIS3	diese Arbeit
YYW09	WCG4a MAT α vac8::HIS3	diese Arbeit
YYW10	WCG4a MAT α atg11::HIS3	diese Arbeit

3.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm *DH5 α* verwendet. Der *E. coli*-Stamm *XL1-Blue* wurde für die Transformation bei der *in vitro*-Mutagenese verwendet.

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit eingesetzte *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>DH5α</i>	<i>F</i> 'endA1 hsdR17 (<i>r_km_{k+}</i>) supE44 thi-1 recA1 gyrA (<i>Nal_r</i>) relA1 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) _{U169} (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)	Hanahan, 1983 [133]
<i>XL1-Blue</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac</i> [<i>F</i> ' <i>proAB lac^fZ</i> Δ M15 Tn10(<i>Tet^r</i>)]	Stratagene

3.1.3 Plasmide

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Quelle
<i>atg15</i> ^{Y38A} -3xHA	<i>CEN6 URA3 pRS316-atg15</i> ^{Y38A} -3xHA	diese Arbeit
<i>alp</i> ₍₁₋₅₈₎ ^{Y38A} - <i>atg15</i> _{ΔTMD}	2μ <i>alp</i> ₍₁₋₅₈₎ - <i>atg15</i> _{ΔTMD} ^{Y38A} <i>P GAL1</i>	diese Arbeit
GFP-ATG8	<i>CEN6 URA3 GFP-ATG8</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001 [134]
pUG6	<i>loxP-KAN</i> ^R -Kassette	Güldener <i>et al.</i> , 1996 [135]
pRK-NVJ1-GFP	<i>CEN6 LEU2 NVJ1-GFP P CUP1</i>	Pan <i>et al.</i> , 2000
pRS315	<i>CEN6 LEU2</i> Kloniervektor	Sikorski <i>et al.</i> , 1989 [136]
pRS315- <i>atg18</i> -FTTG-HA	<i>CEN6 LEU2 atg18-FTTG-HA</i>	Krick <i>et al.</i> , 2006 [137]
pRS315- <i>ATG18</i> -HA	<i>CEN6 LEU2 ATG18-HA</i>	Krick <i>et al.</i> , 2006 [137]
pRS315- <i>atg21</i> -FTTG-TAP	<i>CEN6 LEU2 atg21-FTTG-TAP</i>	P. Schlotterhose
pRS315- <i>ATG21</i> -TAP	<i>CEN6 LEU2 ATG21-TAP</i>	P. Schlotterhose
pRS316	<i>CEN6 URA3</i> Kloniervektor	Sikorski <i>et al.</i> , 1989 [136]
pRS416-GFP- <i>OSH1</i>	<i>CEN6 URA3 GFP-OSH1</i>	Loewen <i>et al.</i> , 2003 [138]
pRS416- <i>SNA3</i> -GFP	<i>CEN6 URA3 SNA3-GFP</i>	Reggiori <i>et al.</i> 2001 [12]
pRS416- <i>sna3</i> ^{K125R} -GFP	<i>CEN6 URA3 Sna3</i> ^{K125R} -GFP	diese Arbeit
pUE13	<i>CEN6 URA3 pRS316-ATG15-3xHA</i>	U. Epple
pUE38	2μ <i>URA3 atg15</i> _(del2-12) -3xHA	U. Epple
pUE41	<i>CEN6 URA3 HA-ATG15 P GAL1</i>	U. Epple
pUE45	<i>CEN6 URA3 atg15-HA</i> ohne Glykosilierung	U. Epple
pUE46	<i>CEN6 URA3 HA-atg15</i> ohne Glykosilierung <i>P GAL1</i>	U. Epple
pUE51	2μ <i>alp</i> ₍₁₋₅₈₎ - <i>atg15</i> _{ΔTMD} <i>P GAL1</i>	U. Epple
pUE7	2μ <i>URA3 ATG15-3xHA</i>	U. Epple
pUG35	<i>CEN6 URA3 yEGFP3</i> C-FUS Kloniervektor	Hegemann
pUG36	<i>CEN6 URA3 yEGFP3</i> N-FUS Kloniervektor	Hegemann
pYW05	<i>CEN6 URA3 Atg15</i> _{Δ400-520} <i>P MET25</i>	diese Arbeit
pYW06	<i>CEN6 URA3 Atg15</i> _{Δ440-520} <i>P MET25</i>	diese Arbeit
pYW07	<i>CEN6 URA3 Atg15</i> _{Δ480-520} <i>P MET25</i>	diese Arbeit
pYW08	<i>CEN6 URA3 pUG36-GFP-ATG15</i> <i>PMET25</i>	diese Arbeit
pYW09	<i>CEN6 URA3 pUG36-GFP-atg15</i> Deglyc.	diese Arbeit

pYW10	<i>P MET25</i> <i>CEN6 URA3 pUG35-ATG15-GFP</i> diese Arbeit <i>PMET25</i>
pYW11	<i>CEN6 URA3 pUG35-atg15-GFP Deglyc.</i> diese Arbeit <i>P MET25</i>
pYW12	2 μ ALP(1-58)-AUT5mit S-A Austausch diese Arbeit ohne TMD <i>P GAL1</i>
ALP(1-58)- Atg15 Δ TMD ^{Y38A}	2 μ <i>URA3 ALP(1-58)-Atg15ΔTMDY38A P</i> diese Arbeit <i>GAL1</i>

3.1.4 Oligonucleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Operon synthetisiert und sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung
VAC8::HIS forward	CTATAAGGGTGTCTTTCTTCTGTACTATATATACATTTGCAACTAT GCGGATCCCCGGGTAAATTA
VAC8::HIS reverse	AAAATTTTGATAAAAATTATAATGCCTAGTCCCGCTTTTGAAGAAAA TCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>Deletion von VAC8</i>
ATG11::HIS reverse	GAAAGTGGCACCACAATATGTACCAATGCTATTATATGCAAATAT TAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
ATG11::HIS forward	TAAAGTTCATTATATTTCAACAAATATAAGATAATCAAGAATAAAAT GCGGATCCCCGGGTAAATTA <i>Deletion von ATG11</i>
NVJ1::HIS forward	ATAATATCAAAAAAGCTACAAATATAATTGTAAAATATAATAAGCAT GCGGATCCCCGGGTAAATTA
NVJ1::HIS reverse	CGTTGTAAGTGACGATGATAACCGAGATGACGGAAATATAGTACA TTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>Deletion von NVJ1</i>
ATG7::HIS forward	CTAAAGTTCATTATATTTCAACAAATATAAGATAATCAAGAATAAAA TGCGGATCCCCGGGTAAATTA
ATG7::HIS reverse	CGGAAAGTGGCACCACAATATGTACCAATGCTATTATATGCAAAT ATTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC <i>Deletion von ATG7</i>
SNA3mutfor SNA3mutrev	CCTTGATGGACAACAGACAACAGCTCTCTTCCGG CCGGAAGAGAGCTGTTGTCTGTTGTCCATCAAGG <i>zielgerichtete Mutagenese von Sna3^{K125R}-GFP</i>

SNA3Seq1	AATATGGTCTCTGTCCAT
SNA3Seq2	ATGGACAGAGACCATATT
SNA3Seq2	TCTTCCGGCCGTACTTAG
SNA3Seq4	GAATCTCAAGCACAGCCT
SNA3Seq5	TCGTACGATCTTTCACGC
	<i>Sequenzierung Sna3^{K125R}-GFP</i>
Y-A ALP-Atg15for	CAAGCAGTTTTGCACCGGATGCTTTATCGGTAGGGAAGAG
Y-A ALP-Atg15rev	CTCTTCCCTACCGATAAAGCATCCGGTGCAAACCTGCTTG
	<i>zielgerichtete Mutagenese von ALP-Atg15^{Y38A}</i>
Seq1 ALP-Atg15	TCAAAGATAATAGTATCCACTG
Seq2 ALP-Atg15	CAACATTTTCGGTTTGTATTAC
	<i>Sequenzierung ALP-Atg15^{Y38A}</i>
Y-A Atg15HAfor	CTACTTTGCTTTACCGGATGCTTTATCGGTAGGGAAGAGC
Y-A Atg15HArev	GCTCTTCCCTACCGATAAAGCATCCGGTAAAGCAAAGTAG
	<i>zielgerichtete Mutagenese von Atg15^{Y38A}</i>
ATG15 _{Δ400-520}	AACGCAGACCCAATCTTCATGGGTACATGCAACGGAGCTAGTTCA
	AGTTAGGTTCGACCTCGAGTCATGTAATTAG
ATG15 _{Δ440-520}	GACAAGGGCTGGAGTGTAACATGTTCAACCACAGAATCCACAAA
	GTCTAGGTTCGACCTCGAGTCATGTAATTAG
ATG15 _{Δ480-520}	AACTGGAAGTTTATTCCAAGCAGAGACTGGGAATCCTCATCGAGG
	CTCTAGGTTCGACCTCGAGTCATGTAATTAG
ATG15TV Rev	ATGTGGGGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACA
	TGACTCGAGGTCGAC
	<i>Trunkierte Versionen von GFP-ATG15</i>
Spel-AUT5	GCGACTAGTATGTTGCATAAAAGCCCTTCAAG
AUT5-Stop-H3	GCGAAGCTTTTACAACCTCGTATTTGGTGCAG
AUT5-H3	GCGAAGCTTCAACTCGTATTTGGTGCAGAAG
	<i>ATG15-GFP und GFP-Atg15</i>
Seq1	GAGACAACTGGAAACGACAAG
Seq2	CAACTTGAAGTAGCTCCGTTG
Seq3	CAAAGAAAGTACGCCGCTGC
Seq4	CTATCTACAGGCATGGCGTC
Seq5	GACGCCATGCCTGTAGATAG
Seq6	CCCAATATCACAGATAGAGG
Seq7	CCTCTATCTGTGATATTGGG
Seq8	TTTCCAGTTGTCTCATCTTCG
Seq9	CATGGGTACATGCAACGGAG
Seq10	AGTGGCCTGTGACCCATATGG
Seq11	CCATATGGGTACAGGCCACT
	<i>Sequenzierung ATG15-Konstrukte</i>

3.1.5 Wachstumsmedien

Alle Medien wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Feste Kulturmedien (Agarplatten) enthielten zusätzlich 2 % Bacto-Agar. Der pH-Wert der Medien wurde mit NaOH oder HCl eingestellt. Alle Prozentangaben in diesem Abschnitt beziehen sich auf (w / v).

YPD-Medium, pH 5,5:

YPD ist ein Vollmedium für Hefe-Kulturen mit den folgenden Komponenten:

1 %	Bacto [®] Yeast Extract
2 %	Bacto [®] Pepton
2 %	<i>D</i> -Glukose

CM-Medium, pH 5,6:

Das CM-Medium ist ein synthetisches Selektionsmedium für Hefe-Kulturen mit folgenden Komponenten:

0,67 %	Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
2 %	<i>D</i> -Glukose (bzw. <i>D</i> -Galaktose)
0,0117 %	<i>L</i> -Alanin
0,0117 %	<i>L</i> -Arginin
0,0117 %	<i>L</i> -Asparagin
0,0117 %	<i>L</i> -Asparaginsäure
0,0117 %	<i>L</i> -Cystein
0,0117 %	<i>L</i> -Glutamin
0,0117 %	<i>L</i> -Glutaminsäure
0,0117 %	<i>L</i> -Glycin
0,0117 %	<i>L</i> -Isoleucin
0,0117 %	<i>L</i> -Methionin
0,0117 %	<i>L</i> -Phenylalanin
0,0117 %	<i>L</i> -Prolin
0,0117 %	<i>L</i> -Serin
0,0117 %	<i>L</i> -Threonin
0,0117 %	<i>L</i> -Tyrosin
0,0117 %	<i>L</i> -Valin

0,0117 %	myo-Inosit
0,00117 %	p-Aminobenzoensäure

Dem CM-Medium wurde je nach benötigten Selektionsbedingungen folgende Supplemente hinzugefügt:

0,3 mM	<i>L</i> -Histidin
1,7 mM	<i>L</i> -Leucin
1 mM	<i>L</i> -Lysin
0,4 mM	<i>L</i> -Tryptophan
0,3 mM	Adenin
0,2 mM	Uracil

SD(-N)-Medium

Als Hungermedium für Hefe-Kulturen wurde das stickstofffreie SD(-N)-Medium verwendet.

0,67 %	Yeast Nitrogen Base, ohne Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren
2 %	<i>D</i> -Glukose

LB-Medium, pH 7,5

LB-Medium wurde für die Kultivierung von Bakterien-Kulturen verwendet.

1 %	Bacto® Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
0,5 %	Natriumchlorid

Das LB_{Amp}-Medium zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz enthielt zusätzlich 75 µg / ml Ampicillin

SOC-Medium, pH 7,5

Als Medium für Bakterien-Kulturen nach erfolgter Elektroporation diente SOC-Medium mit folgenden Komponenten:

2 %	Bacto® Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
0,4 %	<i>D</i> -Glukose
10 mM	Natriumchlorid

10 mM	Magnesiumchlorid
10 mM	Magnesiumsulfat
2,5 mM	Kaliumchlorid

3.1.6 Antikörper

In Tabelle 4 sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt. Ferner ist die Verdünnung angegeben, in der die Antikörper in der Western Blot Analyse eingesetzt wurden.

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Quelle
anti-Kaninchen-HRPO-Konjugat	1:5000	Medac, Hamburg
anti-Maus-HRPO-Konjugat	1:10000	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-Atg15	1:5000	AG Thumm
Kaninchen-anti-Ape1p	1:5000	Eurogentec, Belgien
Maus-anti-GFP	1:2000	Roche, Mannheim
Maus-anti-HA	1:10000	Santa Cruz, USA
Maus-anti-Pgk	1:10000	Molecular Probes, Leiden, NL

3.1.7 Kits

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Kits

Bezeichnung	Quelle
<i>ECL</i> TM Plus Kit	Amersham Biosciences, GB
<i>ECL</i> TM Kit	Amersham Biosciences, GB
<i>Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System</i>	Amersham Biosciences, GB
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Wizard Plus SV Miniprep Kit</i>	Promega
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuikChange</i> [®] <i>Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene

3.1.8 Chemikalien

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Quelle
2-Deoxy- <i>D</i> -Glukose	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol (β -ME)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Adenin	Sigma, Deisenhofen
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bacto [®] - Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] - Peptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] - Tryptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] -Yeast Extract	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Riedel-De Haën, Seelze
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete [™] Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Sigma, Deisenhofen
Deoxyadenosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Deoxycytidin-triphosphat	Roche, Mannheim
Deoxyguanosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Deoxyguanosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Deoxythymidin-triphosphat	Roche, Mannheim
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
<i>D</i> -Galaktose	Roth, Karlsruhe
<i>D</i> -Glukose	Roth, Karlsruhe
Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard (1kb DNA-Leiter)	Roche, Mannheim
<i>D</i> -Sorbit	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Riedel-De Haën, Seelze
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Filterpapier GB 002 und GB 003	Heinemann, Göttingen
FM4-64	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd, 37 %	Sigma, Deisenhofen
Glasperlen	Schütt, Göttingen
Glycerin	Riedel-De Haën, Seelze
Hering-Sperma-DNA	Promega, Madison, USA
Hoechst 33342	Molecular Probes, Freiburg
Hybond [™] -P	Amersham Biosciences, GB
Hybond [™] -N ⁺	Amersham Biosciences, GB
Isobutanol	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumpermanganat	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Sigma, Deisenhofen
L-Arginin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparagin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparaginsäure	Sigma, Deisenhofen
L-Cystein	Sigma, Deisenhofen
Lectin-TRITC	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutaminsäure	Sigma, Deisenhofen
L-Glycin	ICN Biomedicals, Aurora, USA
L-Histidin	Sigma, Deisenhofen
Liquidblock	Amersham Biosciences, GB
L-Isoleucin	Sigma, Deisenhofen
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
L-Leucin	Sigma, Deisenhofen
L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
L-Methionin	Sigma, Deisenhofen
L-Phenylalanin	Sigma, Deisenhofen
L-Prolin	Sigma, Deisenhofen
L-Serin	Sigma, Deisenhofen
L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen
L-Valin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
myo-Inositol	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdeoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Roche, Penzberg
PEG 3350	Sigma, Deisenhofen
Phenol, TE-gesättigt (Roti [®] -Phenol)	Roth, Karlsruhe
PMSF	Merck, Darmstadt
poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Precision Plus Protein All Blue Standards	Biorad, München
Protogel 30 %	Kimberly Research, Atlanta, USA
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
RNAse A	Applichem, Darmstadt
Salzsäure 37 %	Riedel-De Haën, Seelze
SDS	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Merck, Darmstadt

Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris	ICN Biomedicals, Aurora, USA
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20®	Sigma, Deisenhofen
Uracil	Sigma, Deisenhofen
Uracil	Sigma, Deisenhofen
Yeast nitrogen base	Becton Dickinson, Heidelberg
Yeast nitrogen base w/o amino acids	Becton Dickinson, Heidelberg
Zymolyase T-100	Medac, Hamburg

3.1.9 Geräte

Tabelle 3.8: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Bezeichnung	Quelle
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Axioscope2 Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Blockthermostat BT100	Kleinfeld-Labortechnik, Gehrden
Blotting-Apparatur	Ltf-Labortechnik, Wasserburg
Brutschränke Inkubator 4200	Innova, USA
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	Biorad, München
Elektrophoresekammern für SDS-PAGE	Biorad, München
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Aufnahme von Agarose-Gelen	Canon-Kamera
Laborschüttler für Kulturen (diverse Größen)	A. Kühner, Birsfelden, Schweiz
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fuji/ Raytest, Benelux
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Kelheim
Netzgerät-Elektrophoresis Power Supply Consort E831	Topac, USA
PCR Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Microprocessor pH Meter 537	Hotec Technologies, USA
Photometer Ultrospec 100pro	Amersham Biosciences, GB
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Kelheim
Transilluminator TI 1	Whatman Biometra®, Göttingen
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman, USA
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer Genie2	Scientific Industries, USA
Wasserbad SWB25	ThermoHaake, USA
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Wachstum von Hefezellen

3.2.1.1 Wachstumsbedingungen für Hefezellen

Hefe-Flüssigkulturen wurden mit Zellen von einer Agarplatte mittels eines sterilen Zahnstochers angeimpft bzw. aus einer Vorkultur mit der jeweils angegebenen Verdünnung umgeimpft. Die Inkubation erfolgte soweit nicht anders angegeben auf einem mit 220 Upm betriebenen Schüttler bei 30°C. Auf Agarplatten wurden die Zellen mit einem sterilen Zahnstocher ausgestrichen oder ausgehend von Zellsuspensionen mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert bzw. in Verdünnungsreihen aufgetropft.

3.2.1.2 Dauerkulturen von Hefezellen

Für Dauerkulturen wurde eine Zahnstocherspitze Zellmaterial in 1 ml 15 % (v / v) Glycerin resuspendiert oder 500 µl einer Flüssigkultur mit 500 µl 30 % (v / v) Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch Messung der OD_{600} in einer Verdünnung von 1:100 ermittelt (Extinktion bei 600 nm gegen das reine Medium als Referenz).

3.2.1.4 Bestimmung der Abbaurate von GFP-Osh1p in Deletionsstämmen

Die zu untersuchenden Deletionsstämme wurden mit pRS416-*GFP-OSH1* transformiert. Mit den transformierten Zellen wurde eine Vorkultur in Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit der Vorkultur eine Hauptkultur in Selektionsmedium im Verhältnis 1:3000 angeimpft und erneut über Nacht bei 30°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Die Zelldichte OD₆₀₀ wurde photometrisch bestimmt. 20 OD Zellen wurden zweimal mit SD(-N) gewaschen, in 2 ml SD(-N) aufgenommen und bei 30°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde je 1 OD Zellen entnommen, mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (Abschnitt 3.2.5.1) und die Proben für eine Analyse im Western Blot (Abschnitt 3.2.5.3) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem *ECLTM Plus Kit*.

3.2.1.5 Bestimmung des Abbaus von Kupfer-induzierten Markerproteinen

Für die Expression der Plasmide Tsc13p-GFP und Nvj1p-GFP unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors wurde zunächst über Nacht eine Vorkultur in Selektionsmedium angeimpft. Am nächsten Tag wurde mit der Vorkultur eine Hauptkultur in Selektionsmedium im Verhältnis 1:3000 angeimpft und erneut über Nacht bei 30°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Die Zelldichte OD₆₀₀ wurde photometrisch bestimmt und 50 OD in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (2000 Upm, 5 min, RT) wurde das Sediment in 25 ml Selektionsmedium resuspendiert und je 5 ml auf Reagenzgläser verteilt, denen anschließend die entsprechende Menge Kupfersulfat zugefügt wurde. Die Zellen wurden dann je nach Versuchsansatz für eine bzw. zwei Stunden bei 30°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Um den Abbau des Markerproteins bei Hungerung in SD(-N) zu verfolgen, wurden die Zellen im Anschluss zweimal mit SD(-N) gewaschen, in 2 ml SD(-N) aufgenommen und bei 30°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Zu den Zeitpunkten wurde je 1 OD Zellen entnommen, mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (Abschnitt 3.2.5.1) und die Proben für eine Analyse im Western Blot (Abschnitt 3.2.5.3) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem *ECLTM Plus Kit*.

3.1.2.6 Bestimmung des Abbaus von GFP-Osh1p in temperatursensitiven Stämmen

Um den Abbau von GFP-Osh1p in Abhängigkeit von essentiellen Proteinen untersuchen zu können, wurden temperatursensitive Stämme der entsprechenden Gene von *S. cerevisiae* verwendet. Mit den transformierten Zellen wurden zunächst Vorkulturen in dem entsprechenden Selektionsmedium angeimpft und für zwei Tage bei 23°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Ausgehend von dieser Vorkultur wurden 25 ml Kultur im Verhältnis 1:3000 übergeimpft und erneut für zwei Tage bei 23°C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert. Nach photometrischer Bestimmung der Zelldichte (OD_{600}) wurden 50 OD Zellen entnommen, zweimal mit SD(-N) gewaschen und anschließend in 10 ml Selektionsmedium aufgenommen. Der Ansatz wurde auf zwei 50 ml-Kolben aufgeteilt. Ein Ansatz wurde weiterhin bei 23°C unter Schütteln inkubiert (220 Upm), der andere Ansatz bei 37°C in einem Schüttelwasserbad. Zu den gewünschten Zeiten wurde 1 OD Zellen entnommen, mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (Abschnitt 3.2.5.1) und die Proben für eine Analyse im Western Blot (Abschnitt 3.2.5.3) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem *ECLTM Plus Kit*.

3.2.2 Transformation von Hefezellen

Eine 50 ml-Hauptkultur in YPD-Medium wurde mit einer Vorkultur in der *log*-Phase im Verhältnis 1:10 angeimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,8. Die Zellen wurden abzentrifugiert (RT, 2000 Upm, 5 min), zweimal mit je 10 ml ddH₂O und einmal mit 2,5 ml LiOAc-Sorbitol-Puffer (10 mM Tris/Acetat pH 8,0; 100 mM Lithiumacetat; 1 mM EDTA; 1 M *D*-Sorbitol) gewaschen. Anschließend wurden sie in 100 µl LiOAc-Sorbitol-Puffer resuspendiert und 15 min bei 30°C inkubiert, um kompetente Zellen zu erhalten. Die Zellsuspension wurde in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und mit 300 µl PEG in Li-TE-Puffer (10 mM Tris/Acetat pH 8,0; 100 mM Lithiumacetat; 1 mM EDTA; 40 % PEG 3350) versetzt. Nach Zugabe von 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg / ml) und 1-5 µl der zu transformierenden DNA wurde 30 min bei 30°C und anschließend 15 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen

wurden abzentrifugiert (RT, 3000 Upm, 1 min), in 1 ml CM-Selektionsmedium oder in 1 ml ddH₂O aufgenommen und auf CM-Selektionsplatten ausplattiert.

3.2.3 Isolierung von DNA aus Hefezellen

3.2.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefezellen

1,5 ml einer Übernacht-Kultur in YPD-Medium wurden abzentrifugiert (RT, 13000 Upm, 1min), die Zellen mit 500 µl ddH₂O gewaschen und in 200 µl Breaking-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM Natriumchlorid; 1 mM EDTA; 1 % (w / v) SDS; 2 % (v / v) Triton-X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (0,4-0,5 mm; neutralisiert) und 200 µl Phenol/Chloroform-Lösung (50 % (v / v) Phenol; 50 % (v / v) Chloroform) wurde 2 min bei 30°C gemischt, dann wurden 200 µl ddH₂O zugegeben und zentrifugiert (RT, 13000 Upm, 5 min). Aus der oberen Phase wurden 200 µl in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml Ethanol (-20°C für 10 min) gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (RT, 13000 Upm, 10 min) wurde der Überstand entfernt und das Sediment in 400 µl ddH₂O mit 3 µl RNase A (10 mg / ml; DNase-frei durch Erhitzen auf 100°C) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde erneut durch Zugabe von 1 ml 96 %igem Ethanol (-20°C für 10 min) und 10 µl 5 M Ammoniumacetat gefällt und die DNA abzentrifugiert (RT, 13000 Upm, 10 min). Der Überstand wurde quantitativ entfernt, das DNA-Sediment 20 min bei 37°C getrocknet, in 30 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe (Plasmid Rescue)

Zur Isolierung wurden 2 ml einer Übernachtskultur eines Hefetransformanden in Selektionsmedium geerntet (1 min, 13000 Upm) und in 200 µl Lysepuffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris / HCl pH 8,0) aufgenommen. Dann wurden 200 µl Roti-Phenol[®] sowie 200 µl Glasperlen (0,45-0,5 mm, neutralisiert) zugegeben und die Zellen durch kräftiges Mischen (für 15 min, 4°C) aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation (10 min,

13000 Upm, RT) wurden 200 µl des klaren Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumazetatlösung und dem 2,5-fachen Volumen eiskalten Ethanol wurde die DNA gefällt. Das erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen. Mit dieser Methode wird relativ unreine GesamtdNA erhalten, mit einem niedrigen Gehalt an Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde zur Amplifikation in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert daraus erneut für Folgeexperimente isoliert.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Wachstum von *E. coli*-Kulturen

E. coli-Flüssigkulturen wurden mit Zellen von einer Agarplatte oder aus einer Dauerkultur mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft. Sie wurden über Nacht auf einem mit 220 Upm betriebenen Schüttler bei 37°C inkubiert, dann wurden die Zellen geerntet oder laut Vorschrift umgeimpft. Zellsuspensionen wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf Agarplatten ausplattiert.

3.2.4.2 *E. coli*-Dauerkulturen

Für Dauerkulturen von *E. coli* wurden 500 µl Zellsuspension zu 500 µl 60 % (v / v) Glycerin gegeben und bei -80°C gelagert.

3.2.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen sind in der Lage, von außen zugeführte DNA aufzunehmen. Eine 600 ml Hauptkultur des Stammes DH5 α in LB-Medium bei 37°C wurde mit einer

stationären Vorkultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gekühlt und anschließend abzentrifugiert (4°C, 6500 Upm, 8 min). Dann wurden die Zellen mit zunächst 1 L und danach mit 0,5 L sterilem eiskaltem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde noch mit 20 ml kaltem, sterilen 10 % (v / v) Glycerin gewaschen (4°C, 6500 Upm, 8 min). Die Zellen wurden dann in 2 ml kaltem, sterilen 10 % Glycerin aufgenommen, in 40 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

3.2.4.4 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation ist ein Verfahren, mit dem DNA mittels elektrischer Impulse, welche die Permeabilität der Zellmembran vergrößern, in Zellen eingeschleust werden kann. Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl der zu transformierenden DNA versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation bei 2,3k V, 400 Ω und 25 µF durchgeführt. Die Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl bzw. 500 µl auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4.5 Plasmid-Isolierung aus *E. coli* durch alkalische Lyse

1,5 ml einer Übernacht-Kultur in LB_{Amp}-Medium wurden abzentrifugiert (RT, 13000 Upm, 1 min) und die Zellen in 100 µl Lösung 1 (25 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM D-Glukose; 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 (frisch angesetzt: 200 mM Natriumhydroxid; 1 % SDS) und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurden sofort 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) zugegeben und erneut kräftig gemischt. Nach dem Abzentrifugieren (RT, 13000 Upm, 5 min) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 900 µl Ethanol (100 %) gefällt. Nach 2 min wurde nochmals zentrifugiert (RT, 13000 Upm, 5 min), der Überstand vollständig entfernt

und das Sediment ca. 20 min bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μ l ddH₂O aufgenommen und nach Zugabe 0,5 μ l RNase A (10 mg / ml) 30 min bei RT inkubiert. Danach konnte die DNA bei -20°C gelagert werden.

3.2.4.6 Plasmid-Isolierung aus *E. coli* mit dem Wizard Plus SV Kit

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde das Wizard Plus SV Kit der Firma Promega nach dem entsprechenden Protokoll verwendet.

3.2.4.7 Restriktionsverdau von DNA

Zur Identifizierung und Analyse von DNA-Sequenzen wurde DNA mit sequenzspezifischen Restriktionsenzymen gespalten. Für einen 10 μ l-Verdau wurden zwischen 1 und 10 μ l DNA-Lösung, 2 bis 10 U/ μ L und 1 μ l des jeweiligen 10-fachen Inkubationspuffers eingesetzt. Es wurde mit ddH₂O auf 10 μ l aufgefüllt und 1 bis 2 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. 2 μ l der DNA wurden abgenommen, 4 μ l 10-fach DNA-Probenpuffer (1M Tris/Chlorid pH 8,0; 50 % (v / v) Glycerin; 0,1 % (w / v) Bromphenolblau) hinzugegeben und mit ddH₂O auf 20 μ l aufgefüllt. Der Verdau wurde durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Für präparative Verdaue wurde die fünffache Menge der Standardreaktion eingesetzt und bei Bedarf über Nacht verdaut.

3.2.4.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können im elektrischen Feld in Agarose-Gelen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5%ige (w / v) Agarose-Gele mit 1 μ g / ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer (2 M Tris/Acetat pH 8,1; 100 mM EDTA, 5,7 % Essigsäure) verwendet und in einer Flachbett-Elektrophoresekammer in TAE-Puffer aufgetrennt. Die aufzutrennenden

DNA-Proben wurden mit 10 % 10-fach DNA-Probenpuffer (1 M Tris/Acetat; 50% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau) versetzt und zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen. Unter UV-Licht konnten die Banden durch das eingelagerte Ethidiumbromid optisch ausgewertet werden.

3.2.4.9 Gelextraktion von DNA (*Gel Extraction Kit*)

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Pro Ansatz wurden je 0,5 bis 6 μL DNA-Lösung, 0,3 μL T4-DNA-Ligase (5 U/ μL in Glycerin) und 1 μL 10-fach Ligationspuffer gemischt, mit ddH₂O auf 10 μL aufgefüllt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Herstellung zahlreicher Kopien eines DNA-Moleküls durch enzymatische Vervielfältigung einer ausgewählten Sequenz. Pro Ansatz wurden 10 μL zehnfach PCR-Puffer, je 100 pmol Oligonucleotide, 1 μL Template-DNA, 1 μL dNTP-Mix (je 10 mM), 5 μL DMSO und 1 μL DNA-Polymerase eingesetzt. Bei Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ μL in Glycerin) wurden 1 μL Magnesiumchlorid (30 mM), bei Verwendung von Vent-DNA-Polymerase (2 U/ μL in Glycerin) 0,5 μL Magnesiumsulfat (100 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 100 μL aufgefüllt. Die Reaktionszyklen bestehend aus DNA-Denaturierung, Oligonucleotid-Annealing und Neusynthese wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Das verwendete Temperaturprogramm wurde jeweils auf die eingesetzten Oligonucleotide sowie die Produktgröße abgestimmt. Nach

Beendigung des Programms wurde die Produktbildung durch DNA-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.4.12 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen entsprechend der Herstellerangaben gereinigt.

3.2.4.13 Sequenzierung von DNA

Ein Sequenzieransatz enthielt 1 µl Sequenziermix (enthält Polymerase, fluoreszenzmarkierte dNTPs, 30 mM Magnesiumchlorid und Puffersubstanzen), 0,5 µl Template-DNA, 1 µl Oligonucleotide (1:100 verdünnt), 1,5 µl Sequenzierpuffer und 6 µl ddH₂O. In der PCR-Maschine wurden 25 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 10 s, einer Annealing-Phase von 5 s und einer Elongationsphase von 4 min durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Zugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 1 µl 125 mM EDTA und 50 µl 95 % Ethanol (RT) aufgereinigt. Anschließend wurde zentrifugiert (RT, 13000 Upm, 10 min) und das Sediment mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (RT, 13000 Upm, 10 min). Das Sediment wurde bei 37°C kurz getrocknet und in 30 µl HPLC-Wasser aufgenommen und zur Analyse in die Abteilung für Entwicklungsbiologie der Georg-August-Universität in Göttingen gegeben.

3.2.4.14 *In vitro*-Mutagenese mit dem QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit

Das QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene ist geeignet, um Punktmutationen zu erzeugen und ermöglicht außerdem den Austausch von

Aminosäuren und das Einfügen bzw. Entfernen von Aminosäuren. Dabei ermöglicht das *QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit* die Verwendung von dsDNA-Plasmiden. Besonders wichtig ist die Auswahl der benötigten Mutagenese-Oligonucleotide. Beide Mutagenese-Oligonucleotide müssen die gewünschte Mutation enthalten. Die Oligonucleotide sollten zwischen 25 und 45 Basen lang sein, die T_m sollte bei $\geq 78^\circ\text{C}$ liegen, bei der Berechnung gilt die folgende Gleichung:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarung$$

wobei N die Länge des Oligonucleotides in Basen bedeutet. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Sequenz liegen. Die Oligonucleotide sollten einen GC-Gehalt von wenigstens 40 % aufweisen. Die Synthese des Plasmids mit der gewünschten Mutation erfolgte mittels PCR unter Verwendung der *PfuTurbo* DNA Polymerase nach Herstellerangaben. Diese Polymerase synthetisiert die gewünschten DNA-Stränge, wobei die verwendeten Mutagenese-Oligonucleotide eingebaut werden. Anschließend erfolgte ein *DpnI*-Verdau zum Entfernen des nicht-mutagenisierten DNA-Strangs entsprechend des angegebenen Protokolls. Die Endonuclease *DpnI* schneidet spezifisch methylierte sowie hemimethylierte DNA, die in diesem Fall dem nicht-mutagenisierten Strang entspricht. Anschließend wird eine Transformation des mutagenisierten Plasmids in superkompetente XL1-Blue-Zellen durchgeführt. Abweichend zum Herstellerprotokoll werden die Zellen in 500 μl auf 42°C vorgewärmtes SOC-Medium für 1 h inkubiert (37°C , 220 Upm). Anschließend werden die Zellen auf LB_{Amp} -Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien werden für eine Plasmid-Isolierung verwendet (Abschnitt 3.2.4.6) und die erhaltene DNA sequenziert (Abschnitt 3.2.4.12), ehe sie für nachfolgende Experimente eingesetzt wird.

3.2.4.15 Southern Blot Analyse

Die Identifizierung chromosomaler DNA-Fragmente mittels Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden wurde nach dem Southern Blot Verfahren durchgeführt. Hierbei wurde chromosomale DNA mit Restriktionsendonucleasen verdaut, die DNA-

Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Sonden detektiert.

Zunächst wurde die DNA-Sonde mittels des „Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System“ der Firma Amersham nach dem Protokoll hergestellt. Anschließend wurde ca. 20 µg chromosomale DNA (Abschnitt 3.2.3) mit 10 U einer Restriktionsendonuclease in einem Gesamtvolumen von 50 µl über Nacht verdaut (Abschnitt 3.2.4.7) und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 3.2.4.8). Nach der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel zweimal für 8 min mit Acid-Nicking-Puffer (250 mM Salzsäure), einmal für 15 min mit Denaturierungspuffer (1,5 M Natriumchlorid; 500 mM Natriumhydroxid) und schließlich für 1 h mit Neutralisierungspuffer (500 mM Tris/HCl pH 7,0; 3 M Natriumchlorid) gewaschen. Danach wurde die DNA vom Agarose-Gel auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran mittels eines Diffusionsblotts transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht mit sechsfach SSC-Puffer (90 mM Natriumcitrat; 900 mM Natriumchlorid pH 7,0). Nach dem Transfer wurde die Membran für 5 min mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA an die Membran zu binden. Danach kann die Membran bei 4°C gelagert oder sofort zur Hybridisierung eingesetzt werden.

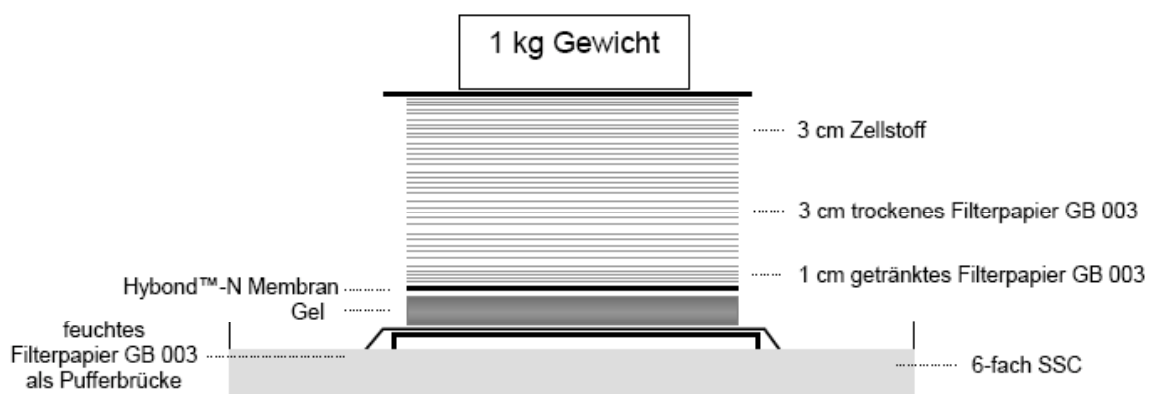


Abbildung 3.1: Aufbau des Diffusionsblotts zur Southern Blot-Analyse

Der Hybridisierungspuffer (0,75 M Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat, 0,1 % (w / v) SDS, 5 % (w / v) Dextransulfat, 5 % Liquid Block) wurde auf 60°C vorgewärmt und die fixierte Membran in den vorgewärmten Hybridisierungspuffer für 3-5 h im Drehofen prähybridisiert. Die Sonde wurde vor der Verwendung 5 min aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt und die Membran damit über Nacht hybridisiert. Die Sonde

kann mehrfach verwendet werden. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für 15 min mit primärem Waschpuffer (150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, 0,1 % (w / v) SDS) bei 60°C und für weitere 15 min mit sekundärem Waschpuffer (75 mM Natriumchlorid, 7,5 mM Natriumcitrat, 0,1 % (w / v) SDS) bei 60°C gewaschen. Die nachfolgenden Waschschrte mit Diluentpuffer (300 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5) für 5 min, mit 10 % Liquid Block für 60 min und weiteren 5 min mit Diluentpuffer erfolgten bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wird das Substrat (AP-Konjugat 1:5000 verdünnt) in Diluentpuffer mit 0,5 % BSA zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Diluentpuffer für jeweils 15 min wurde die DNA schließlich mittels des *Gene Images CDP-Star Detection Reagent* der Firma Amersham detektiert.

3.2.5 Proteinchemische Methoden

3.2.5.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

Für den Zellaufschluss durch alkalische Lyse wurden jeweils 1 OD₆₀₀ logarithmisch bzw. stationär gewachsene bzw. gehungerte Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (3000 Upm, 5 min), das Sediment in 1 ml gekühltem ddH₂O aufgenommen, gemischt und 150 µl gekühlte Lyse-Lösung (frisch ansetzen: 1,85 M Natriumhydroxid; 7,5 % (v / v) β-Mercaptoethanol) hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 50 % Trichloressigsäure (w / v) wurden die Proben gemischt und 10 min auf Eis belassen. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (RT, 13000 Upm, 10 min), das Sediment zweimal mit 100 µl eiskaltem Aceton gewaschen, erneut abzentrifugiert (RT, 13000 Upm, 4 min) und bei 37°C für 10 min getrocknet. Danach wurde das Sediment mit 50 µl 1× Lämmli-Puffer (0,5 M Tris pH 6,8; 0,8 ml Glycerin; 1,6 ml 10 % SDS; Bromphenolblau bis es dunkelblau wird; 1 % β-Mercaptoethanol, wird frisch dazugegeben) versetzt und bei 30°C unter Mischen gelöst. Sind die Proben nach der Zugabe von 1× Lämmli-Puffer gelblich gefärbt, gibt man ca. 1-2 µl 2 M Tris dazu. Vor dem Auftragen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (RT, 13000 Upm, 5 min).

3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli [139] in einer Mini-Protean III Elektrophoresekammer der Firma Biorad nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auftrennung der Proben wurden 8-12 %ige Trenngele mit 5 %igen Sammelgelen verwendet.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Acrylamidgele

	8 % Trenngel	10 % Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	2,4 ml	1,9 ml	3,0 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	-	1,25 ml
Protogel	1,4 ml	1,8 ml	0,7 ml
10 % (w / v) SDS	50 µl	50 µl	50 µl
10 % (w / v) APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	5 µl

Als Molekulargewichtsmarker diente der *Precision Plus all Blue prestained* Standardmarker der Firma Biorad mit folgenden Massengewichten: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa. Nach der Auftragung der Proben (10-20 µl) und Beschickung der Apparatur mit SDS-Laufpuffer (200 mM Glycerin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS) wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 150 V durchgeführt und nach dem Austreten der Bromphenolbande aus dem Gel beendet. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen, das Sammelgel abgetrennt und für die Western Blot Analyse verwendet.

3.2.5.3 Western Blot Analyse

Pro Gel wurden 3 auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere GB 002 in Blotting-Puffer (192 mM L-Glycin; 25 mM Tris; 20 % (v / v) Methanol) äquilibriert. Eine ebenfalls zugeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol und anschließend in Blotting-Puffer äquilibriert. Zwischen den beiden Elektroden einer Semidry Blotapparatur wurde der Blot dann wie folgt aufgebaut: Auf die Kathode wurden drei Filterpapiere gelegt, darauf das SDS-Gel, die PVDF-Membran und nochmals drei Filterpapiere. Die Kammer wurde verschlossen, mit einem Gewicht

beschwert und die Proteine 90 min bei einer Stromstärke von 75 mA pro Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde die PVDF-Membran in 25 ml TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 137 mM Natriumchlorid; Tween 20) mit 10 % (w / v) Magermilchpulver gelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und auf einem Plattformschüttler für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Immunoblot zweimal für je 5 min mit 25 ml TBST-Puffer unter Schütteln gewaschen. Nach dem Abgießen des Puffers wurde der Blot 1 h mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Immunoblot wurde anschließend dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nachdem sechsmal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen wurde, erfolgte die Detektion mit den ECL-Entwicklerlösungen (*ECL*TM Kit oder *ECL*TM Plus Kit) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde der Immunoblot in eine Folie gelegt und mit Hilfe des LAS-3000 Gerätes entwickelt. Die quantitativen Auswertungen der Immunoblots erfolgten mittels der AIDA Software, Version 4.06.116 (Raytest, 2005).

Zur Anfärbung der Membran mit einem weiteren Antikörper wurde die Membran für 5 min mit 25 ml Methanol auf dem Schüttler benetzt, anschließend dreimal für je 5 min mit 25 ml TBST-Puffer gewaschen, dann für 10 min mit 10 % Essigsäure inkubiert und schließlich noch einmal fünfmal für je 5 min mit 25 ml TBST-Puffer gewaschen. Dann wurde die Methode wie oben beschrieben wiederholt, beginnend mit der Inkubation des Immunoblots mit 25 ml 1× TBST-Puffer mit 10 % (w / v) Magermilchpulver.

3.2.5.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung sterilfiltriert. Zu 1 ml stationärer oder für 4 h in SD[140] gehungelter Zellkultur wurde 150 µl Formaldehyd (37 %) und 150 µl 1M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 6,5) gegeben und die Zellen zur Fixierung für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler gedreht. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (RT, 2000 Upm, 5 min) und dreimal mit SP-Puffer (0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat pH 6,5; 1,2 M Sorbitol) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Puffer SP und 20 mM β-

Mercaptoethanol resuspendiert, mit 15 µl Zymolyase-100 T (3 mg / ml) versetzt und 20 bis 30 min bei 30°C sphäroplastiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut sedimentiert (RT, 2000 Upm, 5 min), dreimal mit 1 ml Puffer SP gewaschen und in 1 ml Puffer SP vorsichtig resuspendiert. Die Sphäroplasten können etwa 1 Woche bei 4°C aufbewahrt werden.

20 µl der Sphäroplastensuspension wurden auf mit poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetropft und nach 30 min die gebundenen Zellen dreimal mit 20 µl PBS-Puffer (53 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 13 mM Natriumdihydrogenphosphat; 75 mM Natriumchlorid) gewaschen. Danach wurden die Zellen für 30 min mit 20 µl PBT-Puffer (50 ml PBS; 0,5 g BSA; 25 µl Nonidet P40) und im Anschluss für 2 h mit 15 µl des ersten Antikörpers (1:500 bis 1:1000 in PBT) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit 20 µl PBT-Puffer entfernt und die Zellen mit 15 µl des zweiten Antikörpers (1:8000 in PBT) 1,5 h inkubiert. Die Zellen wurden erneut einmal mit 20 µl PBT-Puffer und fünfmal mit 20 µl PBS-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit 4 µl Citifluorlösung (40 µl / ml DAPI in Citifluor) und einem Deckglas bedeckt, welches mit Nagellack abgedichtet wurde. Die so präparierten Zellen können circa eine Woche aufbewahrt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert werden.

3.2.6 Zellbiologische Methoden

3.2.6.1 Vesikeltest

Der autophagische Prozess ist gekennzeichnet durch die Anreicherung autophagischer Vesikel unter Hungerbedingungen in der Vakuole. In Autophagie-Mutanten können die autophagischen Vesikel nicht mehr ins vakuoläre Lumen gelangen. Zur Überprüfung wurden Hefezellen in Gegenwart des Proteinase B Inhibitors PMSF unter Hungerbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden bis zur stationären Wachstumsphase angezogen, auf Hungermedium gesetzt und unter Anwesenheit von 1 mM PMSF für 2 bis 4 h bei 30°C gehungert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop in der Nomarski-Optik angeschaut.

3.2.6.2 Färbung der vakuolären Membran mit FM4-64

Die Zellen wurden über Nacht bis zu einer Zelldichte von OD_{600} 0,5-0,8 angezogen. 20 OD Zellen wurden durch Zentrifugation (RT, 5 min, 3000 Upm) geerntet und in 1 ml YPD-Medium resuspendiert. Zum Medium wurden 2 μ l einer FM4-64-Lösung (1 mg in 100 μ l DMSO) gegeben und die Zellen für 30 min inkubiert (30°C, 220 Upm). Anschließend wurden die Zellen in frisches YPD-Medium überführt und direkt mikroskopiert oder für 2-4 h in SD(-N)-Medium gehungert und anschließend mikroskopiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter der Verwendung eines CY3-Filters.

3.2.6.3 Färbung des Zellkerns mit Hoechst 33342

Zum Färben des Zellkerns wurden 10 μ l einer 2 mM Lösung des Farbstoffs Hoechst 33324 zu den Zellen gegeben. Nach 15 min Inkubation (30°C, 220 Upm) konnten die Zellen unter Verwendung des DAPI-Filters mikroskopiert werden.

3.2.6.4 Färbung der Sprossnarben von *S. cerevisiae* mit Lectin-TRITC

Für die Färbung der Sprossnarben in Hefezellen wurden 500 μ l Zellsuspension zweimal mit PBS gewaschen und das Sediment in 50 μ l Lectin-TRITC (1 mg / ml in PBS; pH 7,2) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation unter Schütteln im Dunkeln wurde das Sediment dreimal mit PBS gewaschen. Für die anschließende Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein CY3-Filter verwendet.

3.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Autophagie-Mutanten

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Autophagie-Mutanten wurden von Dr. D. Wenzel in Göttingen sowie E. L. Eskelinen in Helsinki durchgeführt. Das verwendete Zellmaterial wurde mit Paraformaldehyd oder Kaliumpermanganat fixiert und verschickt.

3.2.7.1 Fixierung mit Paraformaldehyd

Die Fixierung mit Paraformaldehyd dient der Strukturhaltung von Zellen, die für eine elektronenmikroskopische Immundetektion verwendet werden. Die Zellen wurden über Nacht im entsprechenden Selektionsmedium angezogen, 20 OD Zellen mit einmal mit SD(-N) gewaschen und für 4 h in SD(-N) gehungert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 4 % Paraformaldehyd (v / v in PBS) im Verhältnis 1:1 für 30 min bei RT vorfixiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (RT, 5 min, 3000 Upm) erfolgte eine Inkubation der Zellen über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd. Die Zellen wurden vor dem Versand in frische 4 % Paraformaldehydlösung überführt und standen für eine Einbettung zur Verfügung [141]. Nach der Einbettung und der Probenvorbereitung erfolgt die Immunogoldmarkierung unter Verwendung eines polyklonalen anti-GFP Antikörpers aus Kaninchen.

3.2.7.2 Fixierung mit Kaliumpermanganat

Die Fixierung mit Kaliumpermanganat dient der Strukturhaltung sowie der Kontrastierung von Membranen in den Zellen. Die zu untersuchenden Deletionsstämme wurden in YPD-Vollmedium angezogen, 20 OD Zellen werden mit einmal mit SD(-N) gewaschen und für 4h in SD(-N) gehungert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 5 ml ddH₂O gewaschen (RT, 5 min, 3000 Upm). Die Zellen werden in 5 ml 1,5 % Kaliumpermanganat-Lösung (w / v) resuspendiert, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mehrfach mit ddH₂O gewaschen (RT, 5 min, 3000 Upm)

4. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits Untersuchungen des mikroautophagischen Abbaus des Zellkerns in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt (Abschnitt 4.1) und zum anderen das Protein Atg15p näher charakterisiert (Abschnitt 4.2).

4.1 Mikroautophagischer Abbau von Teilen des Kern-ER in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

In der Hefe *S. cerevisiae* können nahezu alle Komponenten der Zelle durch Autophagie abgebaut werden. Am Zellkern wird dieser Prozess als „piecemeal microautophagy of the nucleus“ (PMN) bezeichnet [119]. Wie auch die Makroautophagie wird PMN durch Nährstoffmangel induziert [119]. Diese Form der Autophagie erfolgt an Kontaktstellen (NV-junctions) zwischen dem Zellkern und der Vakuole, vermittelt durch die Proteine Nvj1p in der äußeren Kernmembran und Vac8p in der Membran der Vakuole [142]. Als Reaktion auf Hungerbedingungen bindet Nvj1p zusätzlich verstärkt die Proteine Tsc13p sowie Osh1p. Beide Proteine sind wichtig für den Lipidstoffwechsel der Zelle [143]. Die an PMN beteiligten Proteine gelangen mit in die Vakuole und werden dort lytisch abgebaut. GFP-Fusionen dieser an PMN beteiligten Proteine können als biochemische Marker für den Prozess verwendet werden, da das GFP proteolytisch recht stabil ist und nachgewiesen werden kann.

4.1.1 PMN als autophagischer Prozess

Roberts *et al.* [119] beschrieben PMN als einen mikroautophagischen Prozess. Sie zeigten, dass der Abbau des Markerproteins Nvj1p unabhängig von der Atg7p-gesteuerten Bildung der Autophagosomen am PAS (präautophagosomale Struktur)

erfolgte. Als biochemischer Marker galt dabei der Abbau von GFP-Nvj1p bei Hungerung in einem Medium ohne Stickstoffquelle (SD(-N)). Das Protein wurde unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors überexprimiert. Die Induktion erfolgte für drei Stunden in Galaktose. Nach 20 h Hungerung in SD(-N) wurde die Abnahme des Fusionsproteins im Western Blot gemessen. In *atg7Δ*-Zellen war der Abbau vergleichbar mit dem im Wildtyp, in *vac8Δ*-Zellen und *pep4Δ*-Zellen war der Abbau blockiert. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Kvam *et al.* [142]. Als Marker diente dabei Nvj1p-Myc, ebenfalls exprimiert unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob in *S. cerevisiae* nicht doch an der Autophagie beteiligte Proteine für PMN nötig sind. Dazu sollten zunächst die erwähnten Markerproteine unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors in den entsprechenden Deletionsstämmen untersucht werden. Zum Vergleich sollten die bereits vorliegenden Daten zu den *atg7Δ*-defizienten Zellen herangezogen werden. Die von Roberts und Kvam beschriebenen Ergebnisse, vor allem die Quantifizierung der Abnahme des Fusionsproteins nach dessen Überexpression, konnten jedoch in dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

Alternativ zu den *GAL1*-exprimierten Proteinen stand das überexprimierende Plasmid *pRK-NVJ1-GFP* unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors zur Verfügung. Pan *et al.* induzierten die Expression von Nvj1-GFP mit 100 μ M Kupfersulfat für zwei Stunden [123]. In dieser Arbeit wurde für den Abbau von Nvj1p-GFP bei Hungerung in SD(-N) zunächst die Expressionsstärke in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* des BY4741-Hintergrundes untersucht (Abbildung 4.1. A). Die Expression von Nvj1p-GFP wurde in stationären Zellen für 0, 1, und 2 Stunden durch Zugabe von Kupfersulfat induziert (Abschnitt 3.2.1.5). Anschließend erfolgte ein Zellaufschluss durch alkalische Lyse (Abschnitt 3.2.5.1). Die Proteinextrakte wurden für einen Western Blot eingesetzt und das Nvj1p-GFP sowie das entstehende freie GFP mit einem Antikörper gegen GFP nachgewiesen. Für eine Ladekontrolle wurden die Membranen entfärbt und erneut mit Antikörper gegen die 3-Phosphoglyceratkinase (Pgk) gefärbt (Abschnitte 3.2.5.2 und 3.2.5.3).

Abbildung 4.1 A zeigt, dass Nvj1p-GFP auch ohne Zugabe von Kupfersulfat bereits schwach exprimiert wurde. Schon 5 μ M Kupfersulfat reichten aus, um die Expression des Fusionsproteins nach einer Stunde zu induzieren. Da Pan *et al.* [123] eine Induktionszeit von zwei Stunden wählten, wurde das Experiment unter diesen

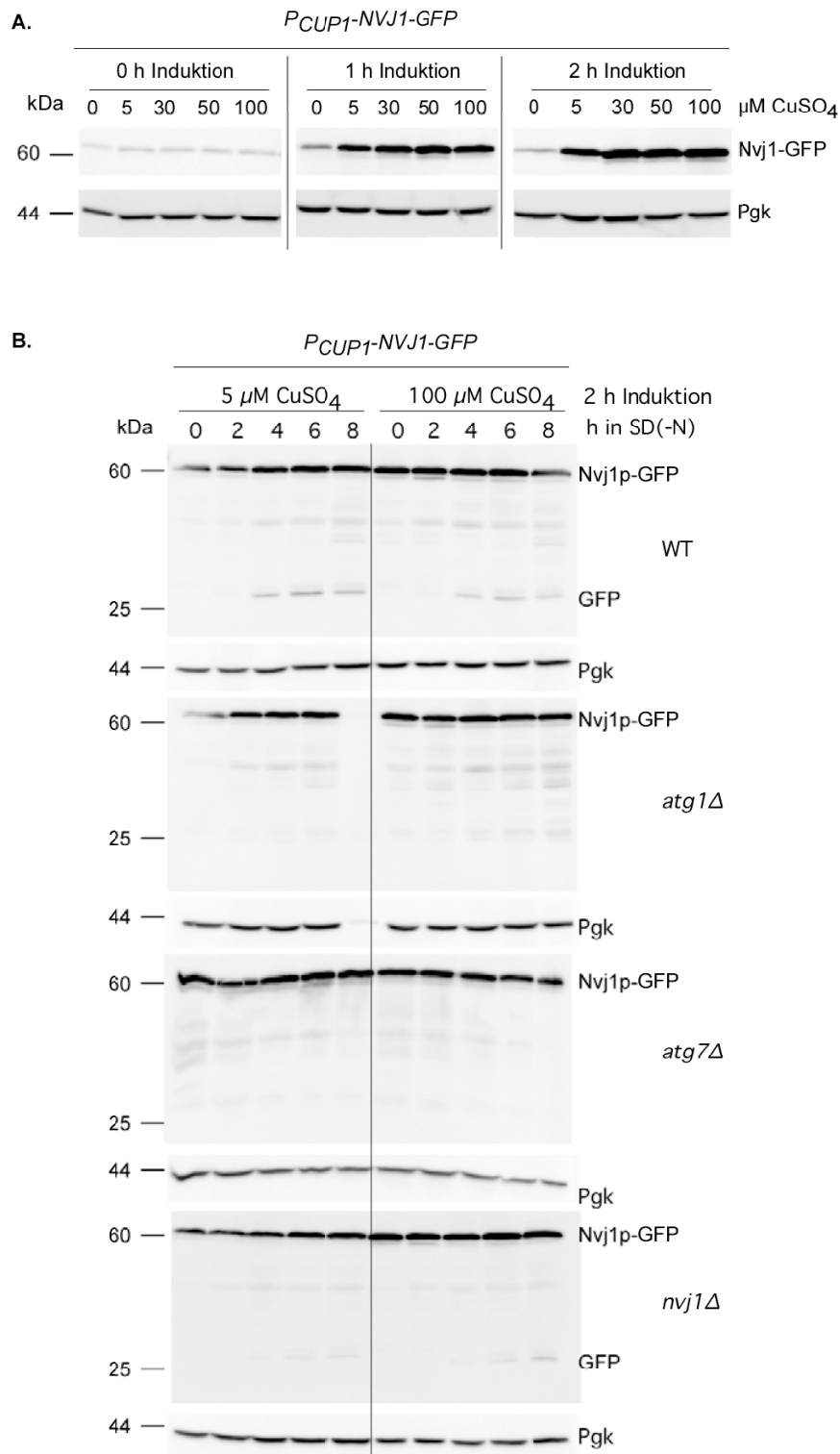


Abbildung 4.1: Der proteolytische Abbau von Nvj1p-GFP in *atg1Δ* und *atg7Δ* ist blockiert. Die Expression von Nvj1p-GFP erfolgte unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors. Der Nachweis von Pgk diente als Ladekontrolle. **A.** Gezeigt ist die Expression von Nvj1p-GFP nach 0, 1, 2 h Induktion mit verschiedenen Kupfersulfat-Konzentrationen. **B.** Die Induktion von Nvj1p-GFP erfolgte für 2 h mit 5 μ M und 100 μ M Kupfersulfat mit anschließender Hungerung in SD(-N).

Bedingungen durchgeführt (Abbildung 4.1 B). In Wildtypzellen konnte freies GFP detektiert werden. In *nvj1Δ*-Zellen wurde nach Induktion der Proteinexpression mit 100 μ M Kupfersulfat und Hungerung in SD(-N) für 8 Stunden freies GFP

nachgewiesen. In *atg1Δ*- und *atg7Δ*-Zellen konnte kein freies GFP detektiert werden. Eine Quantifizierung der Abnahme des Fusionsproteins in den gezeigten Stämmen führte zu keinem reproduzierbaren Ergebnis. In ersten Untersuchungen zeigte sich, dass der verwendete GFP-Antikörper in Zellen mit einem WCG-Hintergrund ein gutes Signal ohne starken Hintergrund ergab.

Für die nachfolgenden Untersuchungen der Beteiligung von Autophagie-Proteinen an PMN wurden im WCG-Hintergrund zunächst Deletionsstämmen von *NVJ1*, *VAC8*, *ATG11* und *ATG7* durch Integration von *HIS3* an Stelle der entsprechenden Gene hergestellt und mittels Southern Blot überprüft (Abschnitt 3.2.4.15). GFP-Osh1p wurde in verschiedenen Deletionsstämmen unter der Kontrolle des *PHO5*-Promotors exprimiert und der Abbau des Markerproteins GFP-Osh1p untersucht.

Nach Induktion der Autophagie durch Stickstoffhungerung von stationären Zellen in SD(-N) erfolgte die Probennahme über einen Zeitraum bis zu zehn Stunden. Mittels alkalischer Lyse wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proben für einen immunologischen Nachweis im Western Blot eingesetzt. Dabei wurde zunächst die Zunahme an freiem GFP mit einem monoklonalen Antikörper untersucht und ggf. quantifiziert. Anschließend wurden die Membranen für die Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen das cytosolische Protein Pgc gefärbt.

In Wildtypzellen im WCG-Hintergrund erfolgte der Abbau von GFP-Osh1p (Abbildung 4.2). Die Zunahme des freien GFP im Verlauf der Hungerung in SD(-N) war deutlich zu erkennen. Als Kontrolle dienten *nvj1Δ* und *vac8Δ*-Zellen, die keine Kontaktstellen zwischen Kern und Vakuole ausbilden können. In diesen Stämmen war der Abbau gegenüber WT-Zellen bis auf ca. 20% reduziert. GFP-Osh1p wird zu einem geringen Teil in den Zellen mislokalisiert. Der Abbau erfolgte über Makroautophagie und entsprach der gemessenen Restaktivität. Fehlten die Autophagie-spezifische Kinase Atg1p oder das E1-Ubiquitin aktivierende Enzym Atg7p, ließ sich kein freies GFP detektieren. Ebenso fehlte der Abbau im Deletionsstamm *atg8Δ*, in dem Makroautophagie sowie Mikropexophagie blockiert sind und in Zellen, denen das an der präautophagosomalen Struktur lokalisierte Atg9p fehlt.

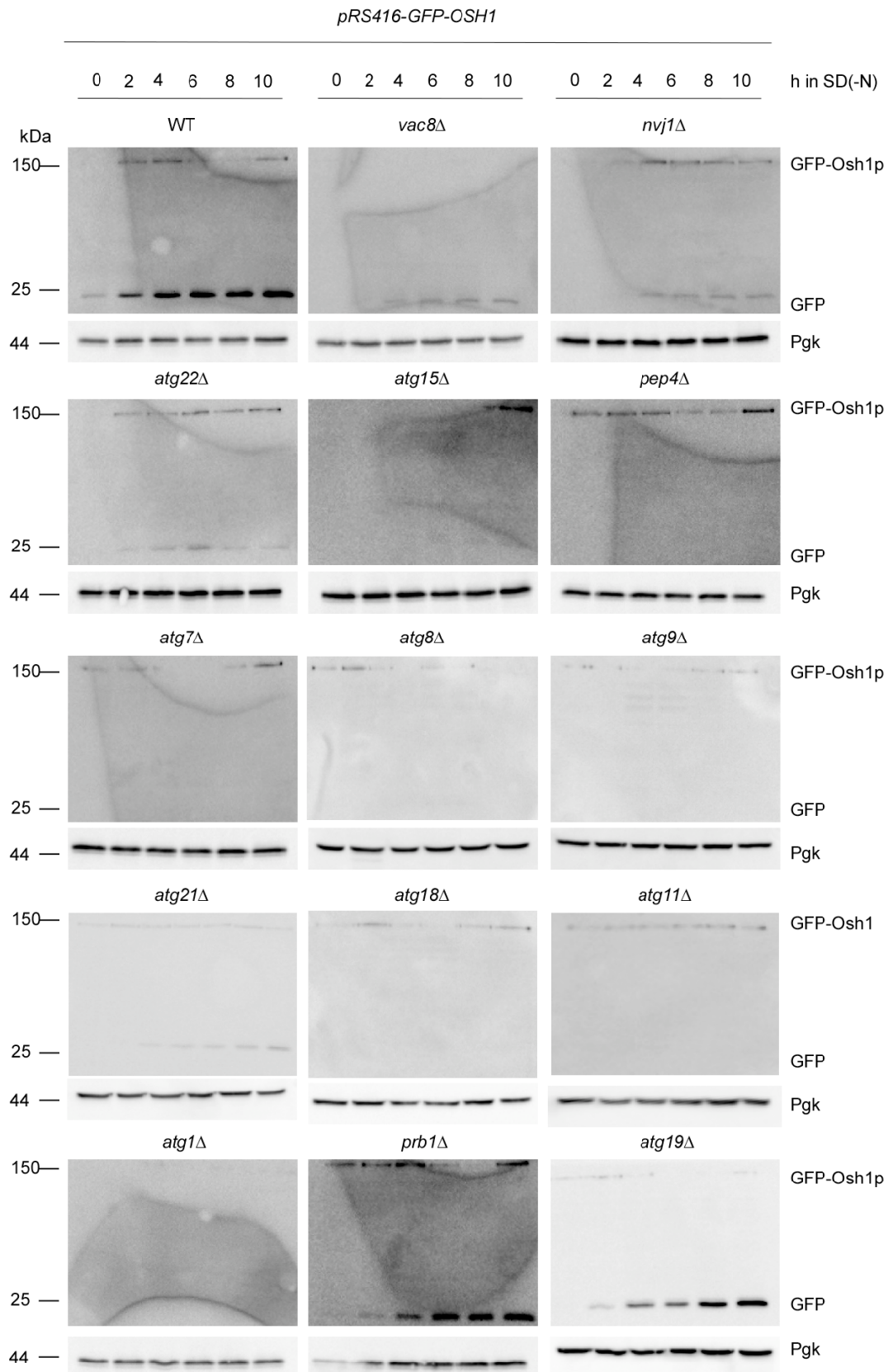


Abbildung 4.2: Abbau von GFP-Osh1p in verschiedenen Autophagie-Mutanten. Gezeigt sind verschiedene Deletionsstämme im WCG-Hintergrund. Die stationären Zellen wurden für insgesamt zehn Stunden in SD(-N) gehungert und nach der Probennahme zu den angegebenen Zeiten mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Mit einem Antikörper gegen GFP wird die Zunahme des freien GFP dargestellt. Der Nachweis von Pgk dient als Ladekontrolle.

Atg11p ist nur für den Cvt-Weg essentiell, nicht aber für Autophagie [89]. Für PMN wird es benötigt.

Bei den Stämmen *pep4Δ* und *atg15Δ*, ist die Lyse von autophagischen Vesikeln in der Vakuole blockiert, in *prb1Δ* und *atg22Δ* teilweise. Nur die beiden letzten Stämme zeigten noch eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Abnahme von GFP-Osh1p.

Die Autophagie-Proteine Atg18p und Atg21p binden Phosphatidylinositol-Phosphate PtdIns(3)P sowie PtdIns(3,5)P₂. Der Abbau von GFP-Osh1p in *atg21Δ*-Zellen entsprach nur noch dem der Kontrollen *vac8Δ* und *nvj1Δ*, ohne *ATG18* war der Prozess vollständig blockiert. Beide Proteine werden also für PMN benötigt.

Der Ape1p-Rezeptor Atg19p war nicht an PMN beteiligt. Hier erfolgte der Abbau von GFP-Osh1p vergleichbar zu Wildtypzellen (Abbildung 4.3).

Damit benötigte der Abbau von GFP-Osh1p während PMN sowohl Atg7p als auch weitere Autophagie-Proteine. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu dem durch die Arbeitsgruppe von D.S. Goldfarb beschriebenen Abbau der stark überexprimierten Proteine *GAL1::Nvj1p-GFP* oder *GAL1::Nvj1p-Myc* [119]. [142].

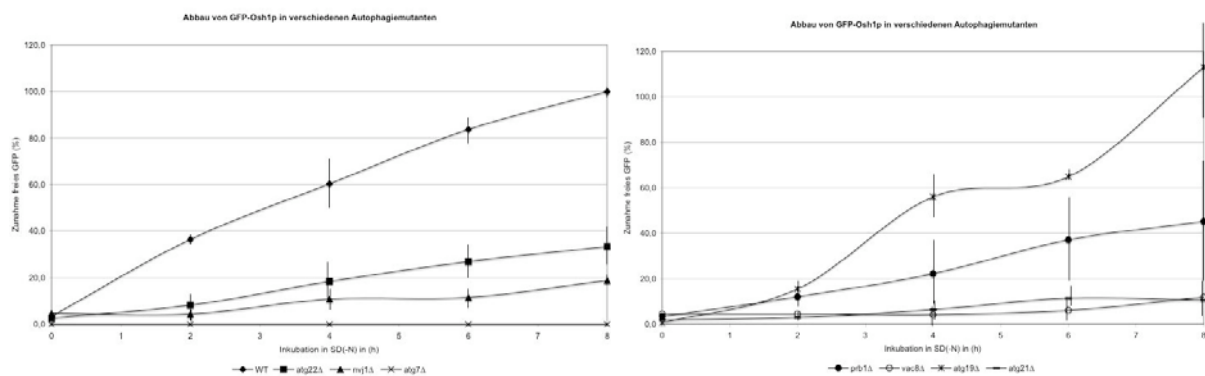


Abbildung 4.3: Quantifizierung des Abbaus von GFP-Osh1p in verschiedenen Autophagie-Mutanten. Als Grundlage der Quantifizierung diente das in Abbildung 4.1 nachgewiesene freie GFP. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen.

In Abbildung 4.4 ist die Morphologie der PMN-Strukturen dargestellt. Abbildung A zeigt die Lokalisierung von GFP-Osh1p. Osh1p war in der Kontaktregion zwischen Vakuole und Kern zu sehen, mit Ausnahme des *NVJ1*-Deletionsstammes, der als Negativkontrolle diente. In den Lyse-defizienten Stämmen *atg15Δ* und *pep4Δ* waren zusätzlich Vesikel in der Vakuole zu erkennen. Diese Vesikel fanden sich auch in den entsprechenden elektronenmikroskopischen Bildern (Abbildung 4.4 B), wobei

hier nicht zwischen PMN-Vesikeln und anderen autophagischen Vesikeln unterschieden werden konnte.

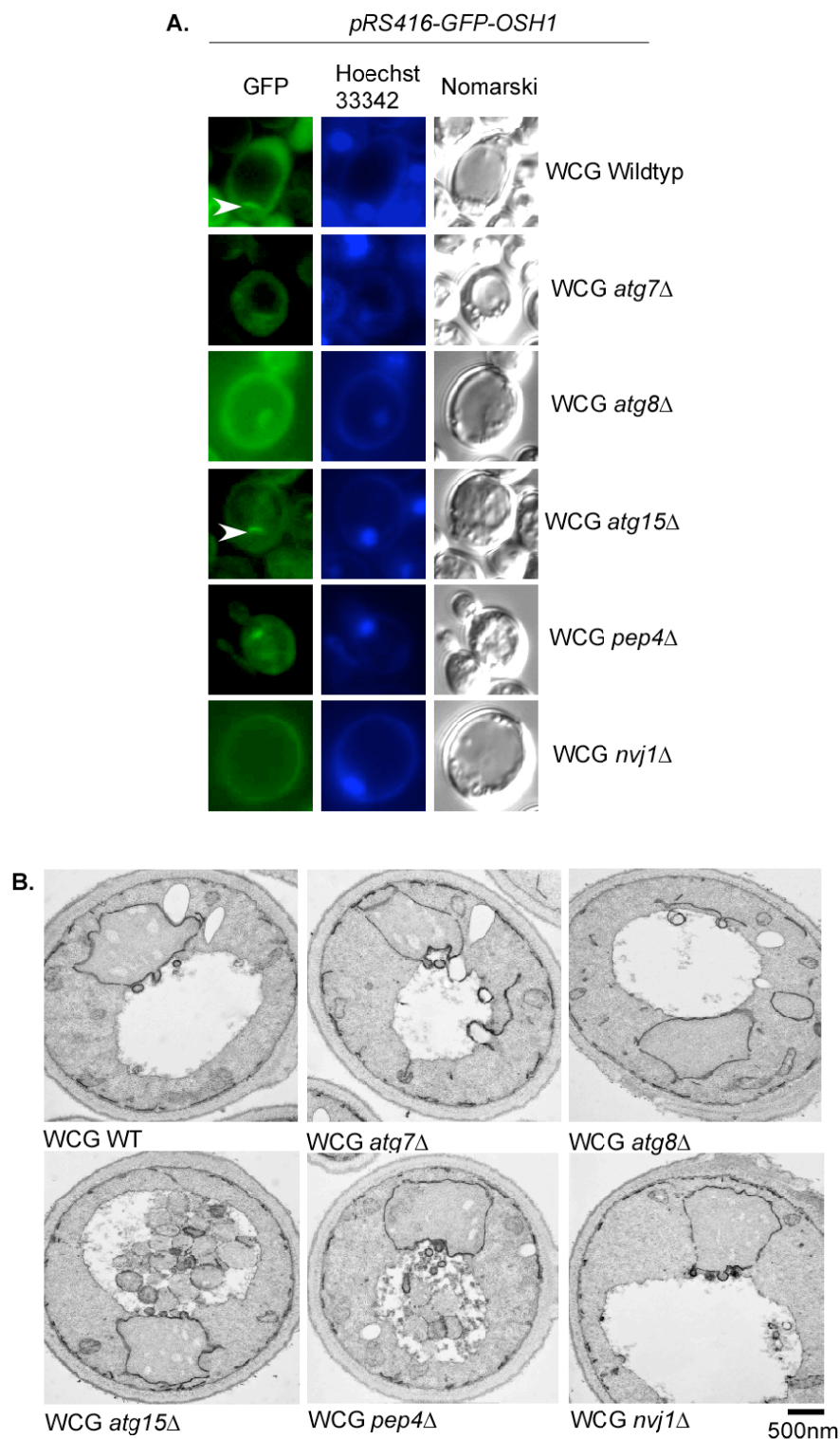


Abbildung 4.4: GFP-Osh1p lokalisiert an der Kontaktstelle von Kern und Vakuole. Abbildung **A.** zeigt Fluoreszenzaufnahmen von GFP-Osh1p nach 4 h Hungerung in SD(-N). Die Pfeile markieren die Kontaktstellen (NV-junctions) zwischen Kern und Vakuole. Zusätzlich ist der Kern der Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt. **B** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Deletionsstämme nach Fixierung mit Kaliumpermanganat (in Zusammenarbeit mit E.L. Eskelinen, Helsinki). In *pep4Δ* und *atg15Δ*-Zellen sind PMN Vesikel in der Vakuole zu erkennen.

Im *atg8Δ* konnten keine PMN-Vesikel nachgewiesen werden. Fehlte *ATG7*, entstanden am Kern zwar Membranausstülpungen, wurden aber offenbar nicht abgebaut (Abbildung 4.2). Im *nvj1Δ* konnten keine Kontaktstellen zur Vakuolenmembran ausgebildet werden.

4.1.2 PMN benötigt die Atg-Proteine der Autophagie-Induktion und der Autophagosomen-Bildung

Nachdem im WCG-Hintergrund einige der *ATG*-Deletionsstämme auf ihre Beteiligung an PMN untersucht wurden, sollten auch die übrigen bisher beschriebenen *ATG*-Gene getestet werden. Nicht alle Deletionsstämme der bisher bekannten Autophagie (*ATG*)-Gene standen im WCG-Hintergrund zur Verfügung. Daher wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit kommerziell erhältlichen *ATG*-Deletionsstämmen im BY4741-Hintergrund (Euroscarf) durchgeführt. Die untersuchten Gene sind sowohl für die durch Nährstoffmangel induzierte Autophagie notwendig, als auch für den konstitutiven Cvt-Weg (cytoplasm to vacuole targeting) [85].

Wie für Abbildung 4.2 beschrieben, wurde der Abbau von GFP-Osh1p untersucht. Ließ sich nach Hungerung der transformierten Deletionsstämme in SD(-N) freies GFP detektieren, war das entsprechende Genprodukt nicht notwendig für PMN.

Der Atg1p-Komplex ist an der Induktion der Autophagie und des Cvt-Weges beteiligt. Die Regulation erfolgt hauptsächlich über die Tor-Kinase, die den Phosphorylierungsstatus von Atg13p und Atg1p bestimmt [102]. Atg17p ist spezifisch für Autophagie [144]. Fehlten diese Proteine, erfolgte kein Abbau von GFP-Osh1p.

Atg31p ist notwendig für die Bildung der Autophagosomen [145]. Auch in *atg31Δ* Deletionsstämmen fand der PMN-Prozess nicht statt. Atg23p, das für PMN benötigt wurde, findet sich zusammen mit Atg9p, reguliert durch den Atg1p-Atg13p-Komplex, am PAS.

Atg27p (Etf1p) ist ein PtdIns(3)P-bindendes Protein, das auch durch Vps34p reguliert wird. Atg9p kann sowohl am PAS als auch an peripheren Strukturen detektiert werden. Der Transport von Atg9 zwischen diesen Orten erfolgt in Abhängigkeit von Atg27p [146]. Es wurde nicht für PMN benötigt (Abbildung 4.5).

Die an der Bildung autophagischer Vesikel beteiligten Proteine Atg12p, Atg5p, Atg10p, Atg3p und Atg16p [85] waren ebenfalls an PMN beteiligt. Ebenso Atg2p, das für die Fertigstellung der Vesikel notwendig ist [147]. Das am PAS lokalisierte Atg29p ist spezifisch für Autophagie und wird nicht für den Cvt-Weg benötigt [148]. Der Abbau von GFP-Osh1p in *atg29Δ* war reduziert, aber nicht vollständig blockiert.

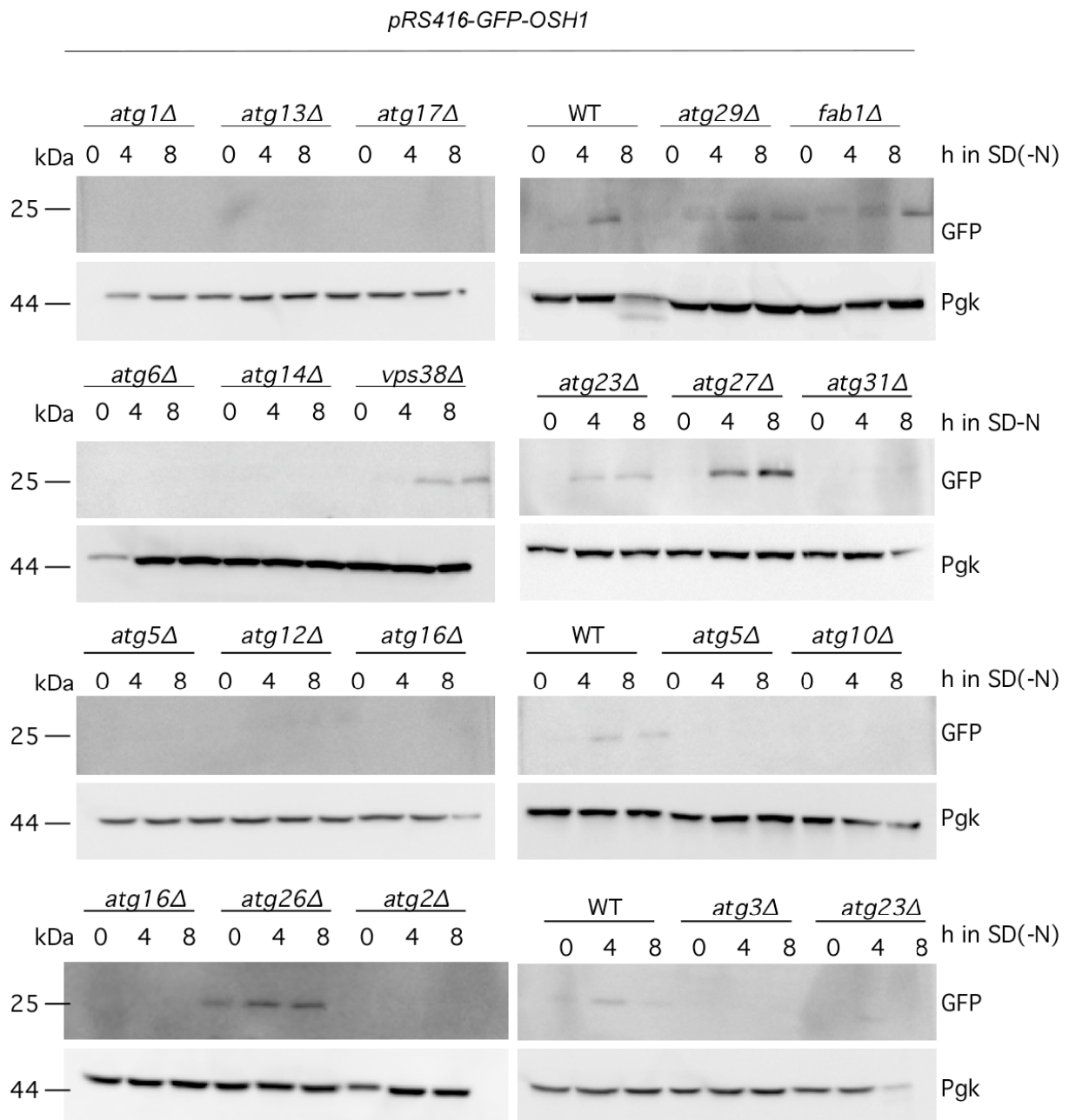


Abbildung 4.5: ATG-Gene mit Funktion im Cvt-Weg sowie der Makroautophagie und ihre Beteiligung an PMN. Die Bildung von freiem GFP zeigt, dass die Genprodukte der entsprechenden Deletionsstämme nicht für PMN benötigt werden. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Pgk.

4.1.3 PMN benötigt den für die Autophagie essentiellen PtdIns-3-Komplex I

Die Derivate des im ER gebildeten Phosphatidylinositols (PtdIns) sind Lipide, die eine charakteristische subzelluläre Verteilung aufweisen und als Signalvermittler dienen [149].

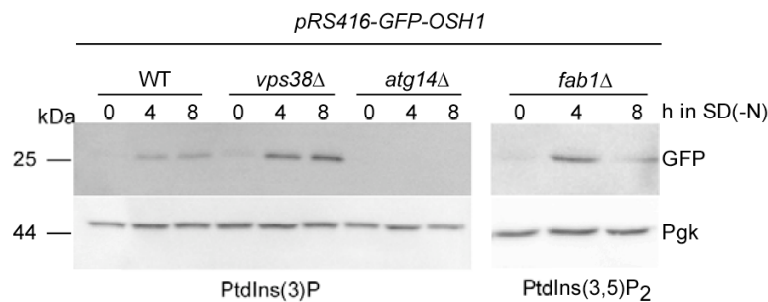


Abbildung 4.6: PMN benötigt PtdIns(3)P aus dem Kinasekomplex I. Vergleich des Abbaus von GFP-Osh1p in Deletionsstämmen im BY4741-Hintergrund. Als Ladekontrolle wurden die Membranen mit Antikörper gegen Pgk gefärbt.

Der PtdIns-3-Komplex besteht aus der Proteinkinase Vps34p, der Serin/Threonin Kinase Vps15 sowie Atg6p. Man unterscheidet in Hefe zwei Vps34p-Kinasekomplexe. Komplex I enthält zusätzlich spezifisch Atg14p und ist an der Regulation und Induktion von Autophagie und dem Cvt-Weg beteiligt. Komplex II enthält stattdessen Vps38p und ist am Endosom lokalisiert. Für PMN war Atg14p und damit der Komplex I notwendig (Abbildung 4.5 und 4.6). Die Kinase Fab1p bildet PtdIns(3,5)P₂ und wurde für den Abbau von GFP-Osh1p nicht gebraucht (Abbildung 4.6).

4.1.4 PMN benötigt die Funktion von Atg18p und das FRRG-Motiv von Atg21p

Die Proteine Atg18p, Atg21p sowie Hsv2p (Ygr223c) sind Sequenzhomologe, die sich jedoch funktionell unterscheiden [150]. Atg18p ist notwendig für die Autophagie und den Cvt-Weg, Atg21p nur für den Cvt-Weg. Hsv2p ist weder für die Autophagie noch für den Cvt-Weg essentiell. Über ein FRRG-Motiv in ihren WD-40 Domänen können die drei Proteine PtdIns(3)P sowie PtdIns(3,5)P₂ binden [150], [137].

Wie bereits erwähnt war in *atg18Δ*-Zellen der Abbau des PMN-Markers GFP-Osh1p blockiert, in *atg21Δ* war der Prozess bis auf die wohl aus der Makroautophagie resultierende Restaktivität reduziert (Abbildung 4.2 und 4.3).

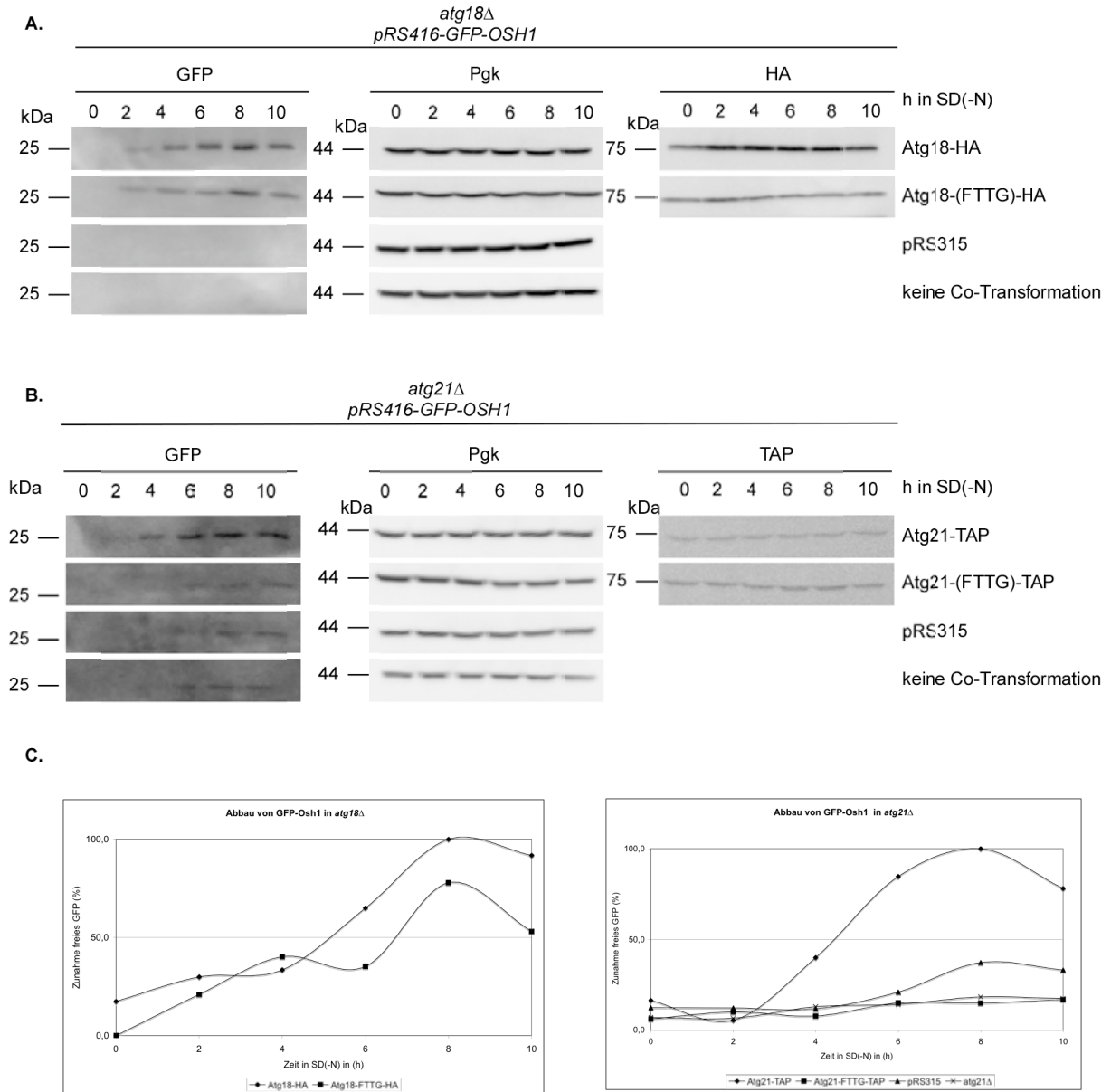


Abbildung 4.7: PMN benötigt das FRRG-Motiv in Atg21p und die Funktion von Atg18p unabhängig vom FRRG-Motiv. Die GFP-Osh1p exprimierenden Deletionsstämme *atg18Δ* sowie *atg21Δ* im WCG-Hintergrund wurden zusätzlich mit Plasmiden transformiert, die das Wildtyp-Protein (FRRG) bzw. das Protein mit mutierter PtdIns-Bindestelle (FTTG) enthalten. Als Kontrolle dienen der leere Vektor sowie Deletionsstämme ohne Cotransformation. **A.** Detektion von freiem GFP in *atg18Δ* **B.** Detektion von freiem GFP in *atg21Δ*. Als Ladekontrolle diente Pgk. TAP und HA-Antikörper dienten zum Nachweis der jeweiligen Fusionsproteine. **C.** Quantifizierung der Zunahme an freiem GFP bei Hungerung in SD(-N).

Abbildung 4.7 zeigt noch einmal die untersuchten Deletionsstämme. Die Stämme exprimierten entweder nur GFP-Osh1p (keine Cotransformation) oder zusätzlich zum

GFP-Osh1p das entsprechende Protein (Atg18p bzw. Atg21p) mit dem normalen FRRG-Motiv oder das Protein mit dem mutierten FTTG-Motiv. Als Kontrollen dienten Deletionsstämme, in die neben GFP-Osh1p noch ein leerer Vektor (pRS315) transformiert wurden. Atg18p wurde als HA-Fusionsprotein exprimiert, Atg21p mit einer C-terminalen TAP-Fusion. Beide Fusionsproteine sind biologisch aktiv. Die Proteine konnten daher mit den entsprechenden Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden.

Wenn in *atg18Δ*-Zellen Atg18-HA oder Atg18-(FTTG)-HA zusätzlich zum GFP-Osh1p exprimiert wurde, dann erfolgte in beiden Fällen wieder der Abbau von GFP-Osh1p (Abbildung 4.7 C). Folglich benötigte PMN die PtdIns-Bindung an Atg18p über das FRRG-Motiv nicht. In den Kontrollen ließ sich kein freies GFP detektieren.

In der Cvt-Mutante *atg21Δ* war der Abbau von GFP-Osh1p trotz der Expression von Atg21-(FTTG)-TAP reduziert (Abbildung 4.7 C). Im Fall von Atg21p war also die Bindung an PtdIns über das FRRG-Motiv notwendig für PMN.

Diese Ergebnisse stimmen mit Experimenten überein, die zeigen, dass Atg18p-FTTG zwar keine Funktion mehr im Cvt-Weg zeigt, während es in der Autophagie noch aktiv ist. Auch Atg21p-FTTG zeigt keine Funktion im Cvt-Weg mehr [137].

Hsv2p bindet wie Atg18p PtdIns(3,5)P₂ [150]. Im Deletionsstamm von *HSV2* (*YGR223c*) ist noch freies GFP detektierbar, aber im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abbildung 4.8).

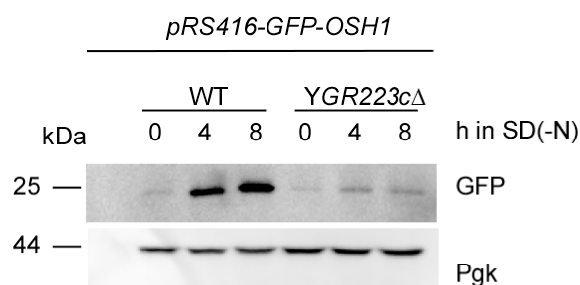


Abbildung 4.8: In *hsv2Δ* ist PMN reduziert. Dargestellt ist der Abbau von GFP-Osh1p in Hsv2p (*Ygr223c*), einem PtdIns-bindenden Homolog von Atg18p und Atg21p. Mit dem Nachweis von Pgk erfolgte die Ladekontrolle.

4.1.5 PMN benötigt spezielle Komponenten des Cvt-Weges

Aminopeptidase I (Ape1p) wird als ein 61 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert. Der Transport zur Vakuole durch Autophagie oder den Cvt-Weg kann anhand der proteolytischen Umwandlung der ungereiften proApe1p zur 50 kDa großen, gereiften Form des Enzyms (mApe1p) verfolgt werden. Deletionsstämme, die in wachsenden Zellen unreife Ape1p aufweisen, weisen einen Defekt im Cvt-Weg auf.

Der Cvt-Weg benutzt Komponenten, die zusätzlich Funktion bei Membranfusionen im sekretorischen Proteintransportweg aufweisen.

So sind z.B. die als Sorting Nexine bezeichneten Proteine Atg20p (Cvt20p/Snx42p) und Atg24p (Cvt13p/Snx4p). Sie binden über ihre PX-Domäne und PtdIns(3)P ans PAS [151]. Zu den Sorting Nexinen gehört neben Atg20p und Atg24p auch Snx41p [125]. Gemeinsam konnten die drei Proteine am sog. Retromer, einem Multiproteinkomplex, lokalisiert werden [152]. Zusammen mit dem Retromer vermitteln Snx4p/41/42 in *S. cerevisiae* den retrograden Transport zwischen den frühen Endosomen und dem *trans*-Golgi-Netzwerk [153].

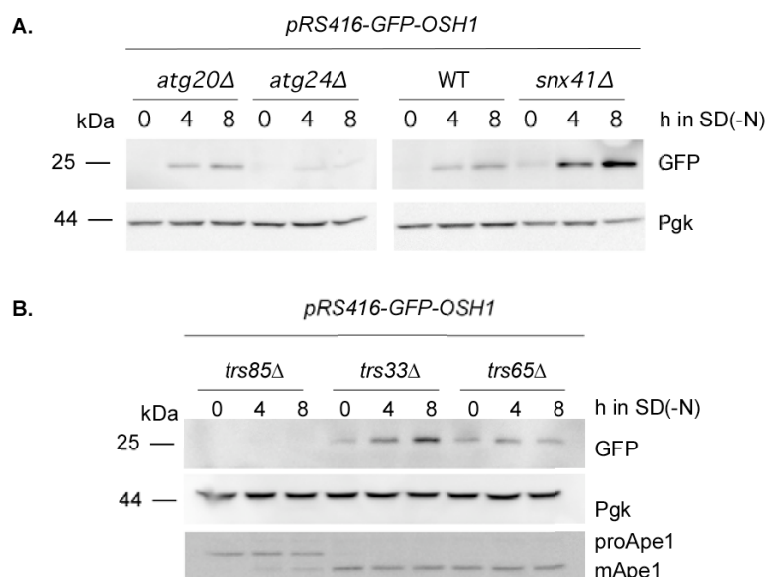


Abbildung 4.9: Bedeutung der Sorting Nexine und von Komponenten des TRAPP-Komplexes für PMN. Mit Antikörper gegen GFP wurde das freie GFP in den gezeigten Deletionsstämmen im BY4741-Hintergrund nachgewiesen. Mit dem Nachweis von Pgk erfolgte die Ladekontrolle. **A.** Gezeigt ist die Bildung von freiem GFP in den Deletionsstämmen der Sorting Nexine. **B.** In TRS85-defizienten Zellen erfolgt kein Abbau von GFP-Osh1p. Die Reifung von proApe1p ist ein Nachweis für die Autophagie.

Abbildung 4.9 A zeigt die Deletionsstämme *ATG20* und *ATG24*. In beiden Fällen ließ sich freies GFP nach Hungerung in SD(-N) nachweisen. In *atg24Δ*-Zellen war der

Abbau von GFP-Osh1p jedoch stark reduziert. In *snx41Δ*-Zellen wurde ebenfalls der Abbau von GFP-Osh1p untersucht. Da freies GFP in dem Deletionsstamm detektiert werden konnte, ist Snx41p nicht an PMN beteiligt.

TRS85-defiziente Zellen haben einen Defekt in der Biogenese von Cvt-Vesikeln [154]. Trs85p gehört neben Trs33p und Trs65p zu den nicht-essentiellen Komponenten der TRAPP-Komplexe (transport protein particle) [140]. Die TRAPP-Komplexe wirken als Tethering Komplexe beim ER-Golgi-Transport sowie beim retrograden Transport im Golgi [46].

In den Deletionsstämmen *trs85Δ*, *trs33Δ* und *trs65Δ* wurde der Abbau von GFP-Osh1p untersucht. Zusätzlich zum Nachweis von freiem GFP als Marker für PMN und Pgc als Ladekontrolle ist die Ape1p-Reifung in den Deletionsstämmen gezeigt. Dazu wurden die Blots nach der Detektion mit dem entsprechenden GFP-Antikörper entfärbt und anschließend erst mit dem Antikörper gegen Pgc und danach gegen die Ape1p inkubiert. *TRS33*- sowie *TRS85*-defiziente Zellen zeigten keinen Defekt der Ape1p-Reifung, in *trs85Δ*-Zellen war die Reifung von Proaminopeptidase I jedoch verlangsamt. Ebenso war der Abbau von GFP-Osh1p in *trs85Δ*-Zellen blockiert, nicht aber in den Deletionsstämmen *trs33Δ* und *trs65Δ*. Daraus folgt das die Funktion des für den Cvt-Weg relevanten Proteins Trs85p auch für PMN benötigt wurde.

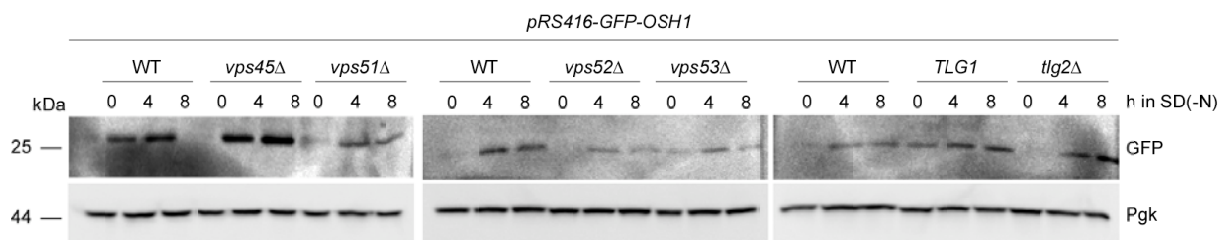


Abbildung 4.10: Der GARP/VFT-Komplex ist an PMN nicht beteiligt. Abbau des PMN-Markers GFP-Osh1p in Deletionsstämmen im BY4741-Hintergrund. Bei *tlg1Δ* handelt es sich um den heterozygoten Stamm. Als Ladekontrolle dient Pgc.

Der am Golgi lokalisierte GARP/VFT-Komplex (Golgi associated retrograde protein) besteht aus vier Untereinheiten: Vps51, Vps52p, Vps53p und Vps54p. Der GARP-Komplex ist der Effektor der GTPase Ypt6p. Der Komplex wird im retrograden Transport zum späten Golgi benötigt [155]. Vps51 vermittelt für Membranfusionen die Bindung des Komplexes am t-SNARE Tlg1p. Als weiteres t-SNARE bindet Tlg2p, das mit dem Sec1p-Homolog Vps45p interagiert. Tlg1p, Tlg2p und Vps45p werden außerdem für die Bildung der Cvt-Vesikel benötigt, nicht aber für Makroautophagie [156]. Auch die Komponenten des GARP-Komplexes haben einen Cvt-Phänotyp.

Für PMN wurde diese Funktion nicht benötigt (Abbildung 4.10), der Abbau von GFP-Osh1p in den entsprechenden Deletionsstämmen war nicht blockiert.

4.1.6 PMN benötigt Komponenten der homotypischen Vakuolenfusion

Jede Membranfusion benötigt ein charakteristisches Set an Proteinen [157]. Während der PMN müssen mindestens zwei Membranfusionen erfolgen: zunächst eine Fusion der ER-Membranen und anschließend eine Fusion der Vakuolenmembran.

Abbildung 4.11 zeigt anhand der Deletionsstämmen im BY4741-Hintergrund, dass für die homotypische Vakuolenfusion erforderliche Proteine auch an PMN beteiligt waren.

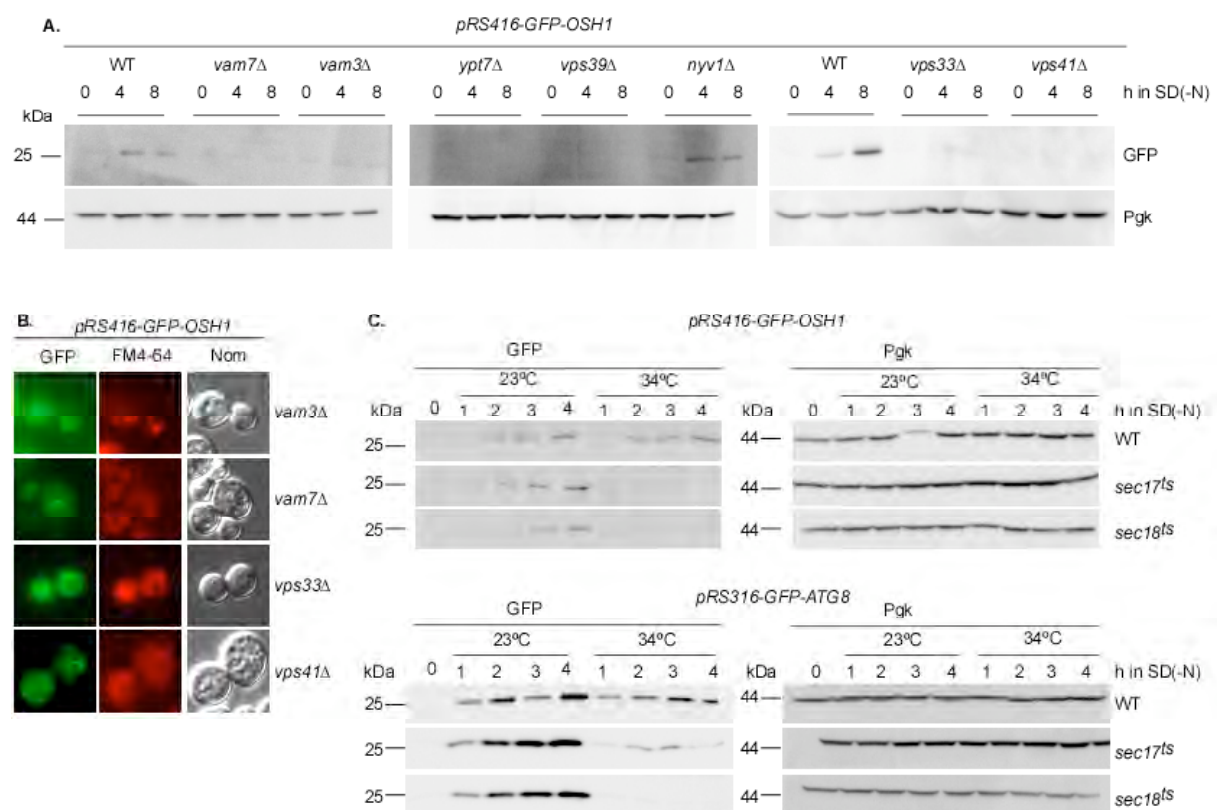


Abbildung 4.11: PMN benötigt Komponenten der homotypischen Vakuolenfusion. **A.** Abbau von GFP-Osh1p in Deletionsstämmen mit Defekten der Vakuolenfusion. **B.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Lokalisierung von GFP-Osh1p sowie die Färbung der Vakuolenmembran mit FM4-64. **C.** Nach der Expression von GFP-Osh1p und GFP-Atg8p in temperatursensitiven Stämmen von *SEC17* und *SEC18* wurde das freie GFP im Western Blot nachgewiesen. Für die Ladekontrolle wurde Pgk detektiert.

Die t-SNAREs Vam3p und Vam7p waren beim Abbau von GFP-Osh1p notwendig, nicht aber der v-SNARE Nyv1p. Ykt6p, ein essentieller ein v-SNARE, wurde nicht untersucht. Ebenfalls relevant für den Abbau von GFP-Osh1p während PMN waren die RabGTPase Ypt7p und das dazugehörige Guaninnucleotid-Austauschprotein Vps39p. Vps41p gehört zu den Proteinen des HOPS-Komplexes, die als *Tethering Faktoren* die Spezifizierung der Fusion vermitteln. Fehlte *VPS41*, erfolgte kein Abbau von GFP-Osh1p. Das zur Familie der Sec1/Munc18 ähnlichen Proteine gehörende Vps33p wurde ebenfalls für den Abbau von GFP-Osh1 benötigt.

Abbildung 4.11 B zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einiger Deletionsstämme der Vakuolenfusion. Die Anreicherung von GFP-Osh1p an der Kontaktstelle von Zellkern und Vakuole war zu erkennen, ein Abbau erfolgte nicht (Abbildung 4.11 A). Die Färbung mit FM4-64 zeigte die Vakuolenmembran. So wurde z.B. die Fragmentierung der Vakuole in *vps41Δ* sichtbar. Das am *Priming* beteiligte NSF-Protein Sec18p und der dazugehörige α -SNAP Sec17p sind essentiell. Der Einfluss dieser Proteine auf den Abbau des PMN-Markers GFP-Osh1p wurde daher in *ts*-Mutanten des RSY255-Hintergrundes untersucht. Bei der permissiven Temperatur von 23°C erfolgte ein Abbau von GFP-Osh1p in den *ts*-Mutanten von Sec17p und Sec18p wie im Wildtyp. Nach einer Temperaturerhöhung auf 34°C war der Abbau in den untersuchten Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp blockiert.

Zusätzlich sollte als Kontrolle auch die Abhängigkeit der Autophagie von Sec17p und Sec18p gezeigt werden. Dazu wurde der Abbau von GFP-Atg8p in den Stämmen untersucht. Atg8p ist für die Induktion der Autophagie essentiell. In beiden *ts*-Mutanten sowie im Wildtyp konnte nach der Hungerinduktion bei 23°C eine Zunahme an freiem GFP nachgewiesen werden. Fehlte die Funktion der Proteine durch die Temperaturerhöhung auf 34°C, war für *sec17^{ts}* nur noch ein schwacher Abbau von GFP-Atg8p zu erkennen; in *sec18^{ts}* fand kein Abbau mehr statt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Abbau von GFP-Osh1 die an der Vakuolenfusion beteiligten SNAREs, die GTPase sowie den NSF und den zugehörigen α -SNAP benötigte. Ebenso waren Komponenten des HOPS-Komplexes notwendig.

4.1.7 Die vakuoläre ATPase und LMA1 sind nicht an PMN beteiligt

LMA1 ist ein Komplex aus Thioredoxin und Pbi2p. Er interagiert mit dem t-SNARE Vam3p und ist am *Priming* während der Vakuolenfusion beteiligt [45]. Vor der Fusion wird LMA1 auf das vakuoläre Chaperon Vtc3p übertragen [63]. Pbi2p war für die Fusion während PMN nicht notwendig (Abbildung 4.12), im Deletionsstamm ließ sich freies GFP nachweisen.

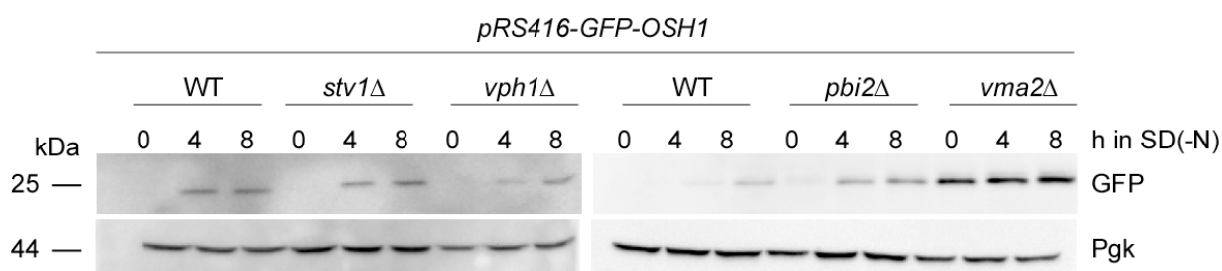


Abbildung 4.12: PMN benötigt die Untereinheiten der V-ATPase und Pbi2p nicht. Gezeigt werden das freie GFP resultierend aus dem Abbau von GFP-Osh1p sowie der Nachweis von Pgk als Ladekontrolle.

Vakuoläre ATPasen bestehen aus mehreren Untereinheiten. Die periphere Untereinheit V_1 enthält Vma2p und sorgt für die ATP-Hydrolyse. Vph1p ist die integrale V_0 -Untereinheit der V-ATPase. Stv1p hat eine 54% Identität mit Vph1p und ist ein funktionelles Homolog [158]. *STV1*, *VPH1* und *VMA2* wurden nicht für den Abbau von GFP-Osh1p gebraucht.

Der VTC-Komplex (vacuolar transporter chaperone) ist unter Autophagie-Bedingungen an der Vakuolenmembran lokalisiert [159]. Es wurde beschrieben, dass er an der homotypischen Vakuolenfusion beteiligt ist und auch für eine spezielle Form der Mikroautophagie benötigt wird [159]. Mit Ausnahme von *VTC3*, dessen Deletion zu einem reduzierten Abbau von GFP-Osh1p führte, wurden die VTCs für PMN nicht benötigt (Abbildung 4.13).

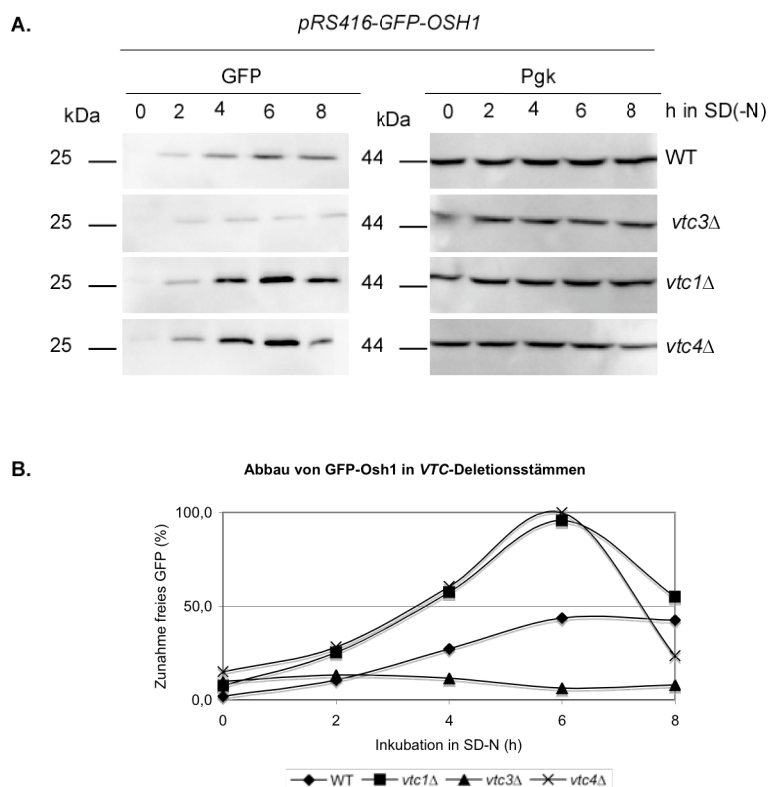


Abbildung 4.13: In *vtc3Δ*-Zellen ist PMN reduziert. A. Freisetzung von GFP aus GFP-Osh1p in den Deletionsstämmen des VTC-Komplexes; Pgc als Ladekontrolle. **B.** Quantifizierung des freien GFP.

4.1.8 Vergleich von PMN mit Mikroauto- und Mikropexophagie

PMN besitzt durch die direkte Einstülpung der Vakuolenmembran morphologische Ähnlichkeit mit mikroautophagischen Prozessen. Im Rapamycin-sensitiven TOR-Signalweg in *S. cerevisiae* wurde die GTPase Gtr2p als positiver Regulator der Mikroautophagie identifiziert [160]. Sie interagiert dabei mit einem an der Vakuolenmembran assoziierten Proteinkomplex, der Ego1p und Ego3p enthält.

In *EGO1*-defizienten Zellen konnte nach Induktion der Autophagie freies GFP nachgewiesen werden. Dieser Bestandteil des EGO-Komplexes wurde folglich nicht für den Abbau von GFP-Osh1p benötigt (Abbildung 4.14).

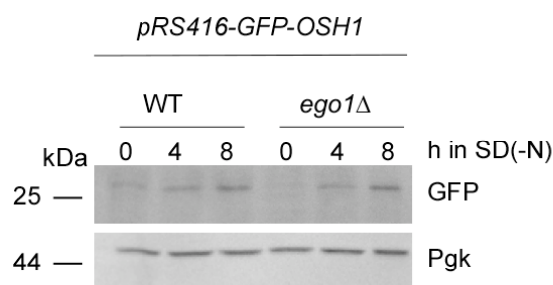


Abbildung 4.14: EGO1 ist nicht an PMN beteiligt. Freisetzung von GFP aus GFP-Osh1p in Deletionsstämmen im BY4741-Hintergrund. Als Ladekontrolle wurden die Membranen mit Antikörper gegen Pgk gefärbt.

Die an der Pexophagie in *P. pastoris* beteiligten Gene *ATG1*, *ATG8*, *ATG16*, *ATG11*, *ATG2*, *ATG4*, *ATG9* und *ATG7* wurden auch für den Abbau von GFP-Osh1p benötigt (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.4).

Atg26p, eine Sterolglucosyltransferase, ist an der Pexophagie in *Pichia pastoris* beteiligt, nicht aber an autophagischen Prozessen in *S. cerevisiae* [161]. An dem hier untersuchten PMN-Prozess war Atg26p nicht beteiligt (Abbildung 4.5).

Für die Pexophagie in *P. pastoris* sind außerdem *GCN1*, *GCN2* und *GCN4* notwendig (Mukaiyama, 2002 #165), [1]. Die in Abbildung 4.4 und 4.14 dargestellten Deletionsstämme *gcn1*Δ und *gcn2*Δ zeigten im Gegensatz dazu normalen Abbau von GFP-Osh1p und sind daher nicht an PMN beteiligt. Im Deletionsstamm von *GCN4* ist die Freisetzung von GFP etwas reduziert.

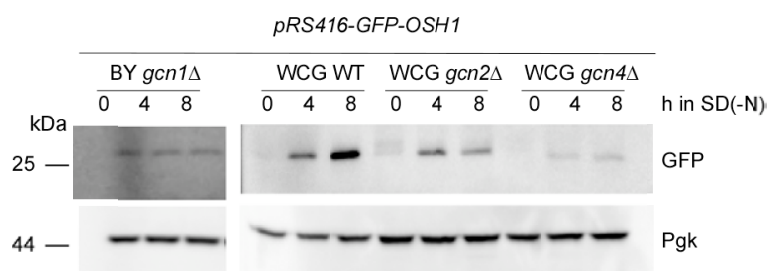


Abbildung 4.15: Die regulatorischen GCN-Gene sind nicht notwendig für PMN. Der Abbau von GFP-Osh1p wurde sowohl im BY4741- als auch im WCG-Hintergrund untersucht. Der Nachweis von Pgk dient als Ladekontrolle.

4.1.9 Das Cdc48p-bindende Protein Shp1p wird für PMN benötigt

Das essentielle *CDC48* ist an der Dissoziation von SNARE-Komplexen während ER-Fusionen beteiligt [162]. Es wechselwirkt dabei mit Shp1p, das eine Ubiquitin-

regulatorische Domäne UBX besitzt. Shp1p gehört damit zur UBX-Proteinfamilie, die aus Ubx1p - Ubx7p besteht.

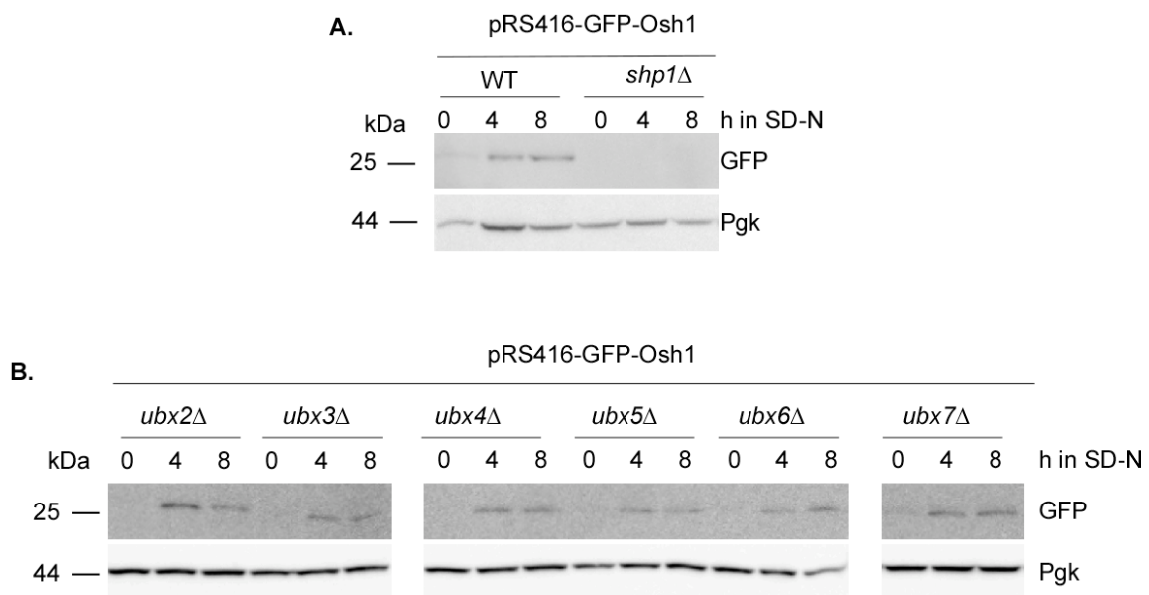


Abbildung 4.16: Das Cdc48p-bindende Protein Shp1p wird für PMN benötigt, nicht aber die übrigen Mitglieder aus der Proteinfamilie mit UBX-Domäne. Abbau von GFP-Osh1pp bei Hungerung in SD(-N) in **A.** *shp1* Δ und **B.** in den Deletionsstämmen *ubx2* Δ - *ubx7* Δ . Als Ladekontrolle wurden die Membranen mit Antikörper gegen Pgk gefärbt.

In *shp1* Δ -Zellen ließ sich kein freies GFP nachweisen. So konnte indirekt eine Beteiligung der ER-Fusionsmaschinerie an PMN gezeigt werden. Die übrigen *UBX*-Deletionsstämmen, die für die Bindung des Cdc48-Komplexes beim Abbau von Proteinen durch das Proteasom nötig sind, wurden für die Freisetzung von GFP aus GFP-Osh1p nicht gebraucht.

Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse für die in dieser Arbeit untersuchten Deletionsstämme und ihre Beteiligung am Abbau von GFP-Osh1p zusammen.

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der untersuchten Gene und ihrer Beteiligung an PMN. Wenn nach der Hungerinduktion durch SD(-N) freies GFP durch den Abbau von GFP-Osh1p in den Deletionsstämmen nachgewiesen werden konnte, waren die entsprechenden Proteine nicht an PMN beteiligt (-). Erfolgte keine Freisetzung von GFP, war das Genprodukt notwendig für PMN (+). In einigen Stämmen war der Abbau von GFP-Osh1p reduziert (red.).

Beteiligung an PMN		Beteiligung an PMN	
Autophagie und Cvt-Weg		GARP-Komplex	
<i>ATG1</i>	+	<i>TLG2</i>	-
<i>ATG2</i>	+	<i>VPS45</i>	-
<i>ATG3</i>	+	<i>VPS51</i>	-
<i>ATG5</i>	+	<i>VPS52</i>	-
<i>ATG6</i>	+	<i>VPS53</i>	-
<i>ATG7</i>	+	Vakuolenfusion	
<i>ATG8</i>	+	<i>NYV1</i>	+
<i>ATG9</i>	+	<i>SEC17</i>	+
<i>ATG10</i>	+	<i>SEC18</i>	+
<i>ATG11</i>	+	<i>VPS33</i>	+
<i>ATG12</i>	+	<i>VPS39</i>	+
<i>ATG13</i>	+	<i>VPS41</i>	+
<i>ATG14</i>	+	<i>VAM3</i>	+
<i>VPS38</i>	-	<i>VAM7</i>	+
<i>ATG15</i>	+	<i>YPT7</i>	+
<i>ATG16</i>	+	V-ATPase und LMA1	
<i>ATG17</i>	+	<i>PBI2</i>	-
<i>ATG18</i>	+	<i>STV1</i>	-
<i>ATG19</i>	-	<i>VMA2</i>	-
<i>ATG21</i>	+	<i>VPH1</i>	-
<i>ATG22</i>	red.	VTC-Komplex	
<i>ATG23</i>	+	<i>VTC1</i>	-
<i>ATG26</i>	-	<i>VTC2</i>	red.
<i>ATG27</i>	-	<i>VTC3</i>	-
<i>ATG29</i>	red.	<i>VTC4</i>	-
<i>ATG31</i>	+	EGO-Komplex	
<i>PEP4</i>	+	<i>EGO1</i>	-
<i>PRB1</i>	-	<i>EGO3</i>	-
PMN		Regulation Mikroautophagie	
<i>NVJ1</i>	+	<i>GCN1</i>	-
<i>VAC8</i>	+	<i>GCN2</i>	-
Sorting Nexine		<i>GCN4</i>	-
<i>SNX4</i>	red.	UBX-Proteine	
<i>(ATG24)</i>		<i>UBX1</i>	+
<i>SNX41</i>	-	<i>(SHP1)</i>	
<i>SNX42</i>	-	<i>UBX2-7</i>	-
TRAPP-Komplexe			
<i>TRS33</i>	-	<i>FAB1</i>	-
<i>TRS65</i>	-		
<i>TRS85</i>	+		

4.2 Untersuchungen zur Lokalisierung, der Aktivität und dem Transport von Atg15p

Im Rahmen dieser Arbeit wurden GFP-Fusionsproteine von Atg15p erzeugt, um durch Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisierung des Proteins untersuchen zu können. Ausgehend von den GFP-Atg15p-Fusionskonstrukten wurden darüber hinaus C-terminal trunkierte Versionen kloniert, um nähere Erkenntnisse zur Funktion des luminalen Proteinabschnittes zu gewinnen. Ein weiteres Fusionskonstrukt aus dem Sortiersignal der Alkalischen Phosphatase Pho8p (ALP) und Atg15p ohne Transmembrandomäne wurde an unterschiedlichen Bereichen des Atg15p mutagenisiert. Zum einen wurde das aktive Serin (Aminosäure 332) im Atg15p durch ein inaktives Alanin ersetzt und so ein inaktives Atg15p erzeugt. Mittels dieser Konstrukte sollte der Einfluss der Aktivität von Atg15p auf das Wachstum verschiedener Deletionsstämme untersucht werden. Zum anderen sollte der Einfluss eines für den MVB-Weg beschriebenen Sortiersignals (PxY-Motiv) untersucht werden. Dazu wurde das Tyrosin des Motivs in dem Atg15p-Konstrukt gegen ein Alanin ausgetauscht, um anschließend die Aktivität und Lokalisierung des so modifizierten Fusionsproteins untersuchen zu können.

4.2.1 Direkte Lokalisierung von Atg15p

4.2.1.1 Klonierung der Konstrukte

Ziel der nachfolgenden Experimente war die Erzeugung von *ATG15*-Fusionen mit N- bzw. C-terminalem GFP unter der Kontrolle des induzierbaren *MET25*-Promotors. Als Ausgangskonstrukte dienten dabei Plasmide, die *ATG15* mit einem N- bzw. C-terminalem HA-Tag enthalten. Der HA-Tag wurde gegen GFP ausgetauscht. Für die Klonierung der N-terminalen Konstrukte wurden die Plasmide pUE41 (pRS316-HA-*ATG15*) und pUE46 (pRS316-HA-*ATG15* ohne die drei Glykosilierungsstellen) verwendet. Die Klonierung der C-terminalen GFP-Konstrukte erfolgte ausgehend von den Plasmiden pUE13 (pRS316-*ATG15*-3xHA) und pUE45 (pRS316-*ATG15*-3xHA

ohne die drei Glykosilierungsstellen). Die Oligonucleotide *SpeI*-Aut5 und Aut5-Stopp-*HindIII* für die N-terminale Fusion bzw. Aut5-Stopp für die C-terminale Fusion wurden für die Amplifikation des *ATG15* benutzt. Die Zielvektoren pUG35 (C-terminales GFP) und pUG36 (N-terminales GFP) wurden mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *HindIII* geschnitten und mit den entsprechenden PCR-Fragmenten ligiert. Es wurden vier Konstrukte erhalten: (I.) pUG36-*MET25*-GFP-*ATG15* und (II.) pUG36-*MET25*-GFP-*atg15* ohne Glykosilierungsstellen sowie (III.) pUG35-*MET25*-*ATG15*-GFP und (IV.) pUG35-*MET25*-*atg15*-GFP ohne Glykosilierungsstellen (Abbildung 4.17). Die Richtigkeit der Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft (Abschnitt 3.2.4.13).

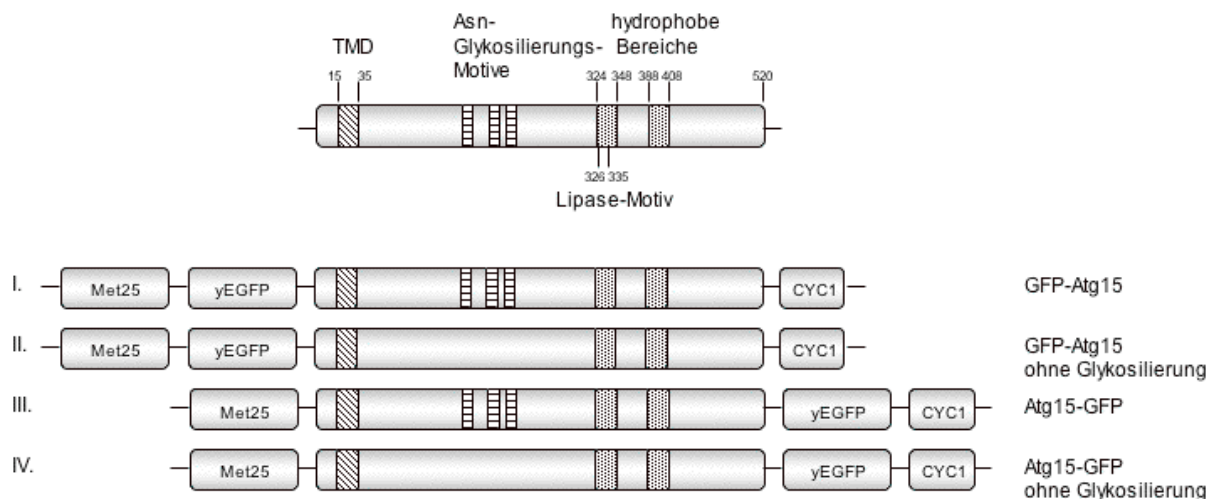


Abbildung 4.17: Übersicht der erzeugten Konstrukte von Atg15p mit N- bzw. C-terminalem GFP.

4.2.1.2 GFP-Atg15p ist biologisch aktiv, Atg15p-GFP ist in seiner Aktivität reduziert

Die Anzucht der Zellen, welche die GFP-Konstrukte exprimieren, erfolgte zunächst in einem Selektionsmedium ohne Methionin, um die Expression zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen für vier Stunden in SD(-N) inkubiert, um die Autophagie zu induzieren. Ein Vesikeltest dient der Überprüfung, ob ein Deletionsstamm essentiell am Mechanismus der Autophagie beteiligt ist (Abschnitt 3.2.6.1). Die Lyse-defizienten Stämme *atg15Δ* und *atg22Δ* weisen auch ohne PMSF-

Zugabe Vesikel in ihrer Vakuole auf. [107]. Können die transformierten Konstrukte den Lysedefekt komplementieren, finden sich in der Vakuole keine Vesikel.

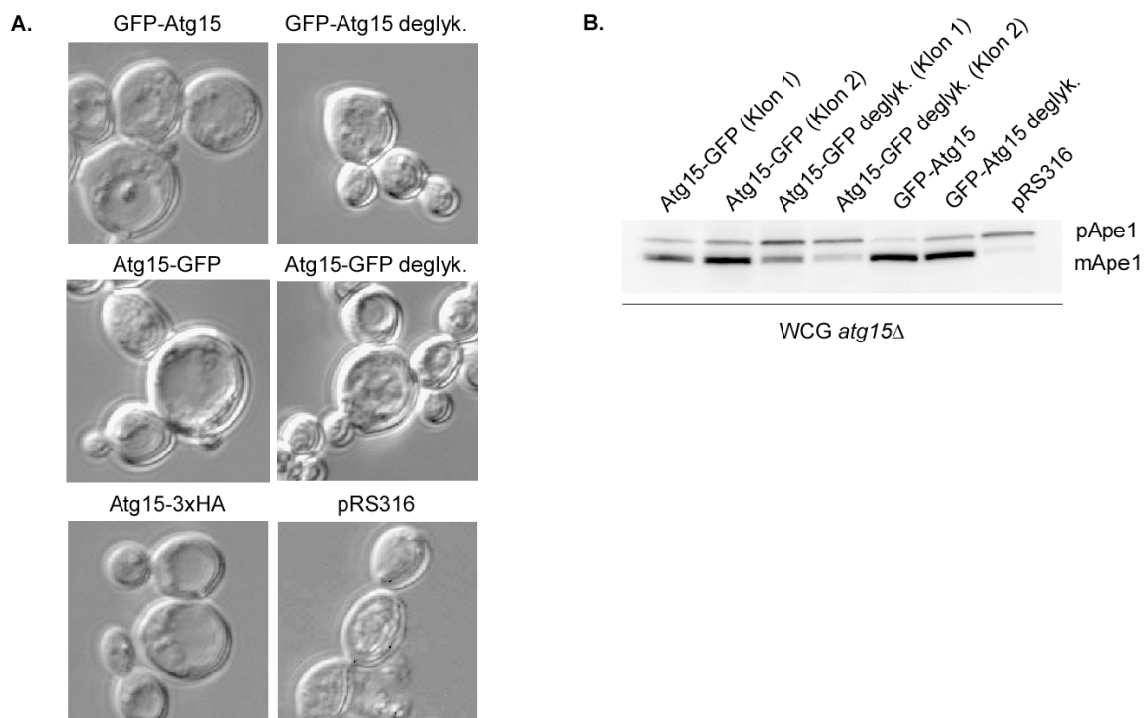


Abbildung 4.18: Die GFP-Fusionen von Atg15p reifen proApe1p. Gezeigt sind die Ergebnisse nach 4 h Hungerung in SD(-N). **A.** Der Vesikeltest im WCG *atg15Δ pep4Δ* wurde ohne Zugabe von PMSF durchgeführt. **B.** Dargestellt ist die Ape1p-Reifung im WCG *atg15Δ*.

In der Positivkontrolle mit Atg15p-3xHA war die Vakuole frei von Vesikeln. Wurde nur der leere Vektor (pRS316) transformiert, reicherten sich Vesikel in der Vakuole an (Abbildung 4.18 A). Das N-terminale sowie das C-terminale GFP-Konstrukt komplementierten ebenfalls, folglich waren die Fusionsproteine aktiv. Fehlten jedoch die Glykosilierungsstellen, reicherten sich Vesikel im *atg15Δ* an.

In *ATG15*-defizienten Stämmen ist die Reifung von proApe1p in der Vakuole blockiert. Ließ sich nach der Transformation der Atg15p-Konstrukte reife Ape1p (mApe1p) nachweisen, so komplementierten die Konstrukte den Deletionsphänotyp. Abbildung 4.18 B zeigt, dass die GFP-Konstrukte im Vergleich zur Kontrolle (pRS316) aktiv waren. Nach der Expression des deglykosylierten Atg15p-GFP wurde nur eine geringe Menge proApe1p gereift. Im Falle des Ape1p-Nachweises waren also im Gegensatz zum Vesikeltest alle GFP-Konstrukte aktiv, vermutlich genügte hier bereits eine geringe Menge an aktivem Atg15p, um proApe1p zu reifen.

4.2.1.3 Überexpression von GFP-Atg15p führt zur ER-Proliferation

Die GFP-Konstrukte von Atg15p wurden erzeugt, um die Lokalisierung des Enzyms direkt fluoreszenzmikroskopisch verfolgen zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.19 zusammengefasst. Die C-terminalen GFP-Konstrukte von Atg15p zeigten nur ein schwaches Signal, das eine erhöhte Belichtungszeit für die mikroskopischen Aufnahmen erforderte. Das Signal fand sich an der vakuolären Membran und in den *atg15Δ pep4Δ*-Zellen verstärkt im Lumen der Vakuole (Abbildung 4.19 A). GFP-Atg15p und GFP-Atg15p ohne Glykosilierungsstellen exprimiert unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors, zeigten in *atg15Δ*-Zellen vor allem eine ringförmige Verteilung am ER und an der Plasmamembran. Diese Verteilung an ringförmigen Bereichen der Plasmamembran erinnert an die Sprossnarben, die bei der Zellteilung von *S. cerevisiae* an den Mutterzellen entstehen. Sie lassen sich mit Lectin-TRITC (Abschnitt 3.2.6.4) selektiv anfärben (Abbildung 4.19 B.). Lectine sind Glykoproteine, die hochspezifisch über multiple Bindungsstellen Zuckerreste der Zellwand binden. Die Verteilung unterscheidet sich in haploiden und diploiden Zellen. In haploiden Zellen finden sich die Sprossnarben eher axial, in diploiden Zellen meist bipolar verteilt [163]. Um eine mögliche Colokalisierung zeigen zu können, wurden GFP-Atg15p exprimierende Zellen mit Lectin-TRITC gefärbt (Abschnitt 3.2.6.4). Eine deutliche Colokalisierung fand sich nur in wenigen Zellen. Daher wurden die GFP-Atg15p exprimierenden Zellen auch mit Elektronenmikroskopie untersucht. Mit einem gegen GFP-gerichteten Antikörper konnte eine ER-Proliferation in diesen Zellen gezeigt werden. Es bildeten sich ER-Membranstackel um den Kern und an der Plasmamembran (Abbildung 4.19 C.). Das GFP-Atg15p reicherte sich im proliferierten ER an. Für eine punktmutierte Carboxypeptidase Y (CPY*), die einen falsch gefalteten Proteinteil im Lumen des ER besitzt ist die Morphologie des ER und auch des Golgi ähnlich verändert [164]. Trotz der Anreicherung im ER gelangte ein Teil des Atg15p in die Vakuole und konnte dort Ape1p-Vesikel lysieren, gezeigt anhand der Bildung von mApe1p (Abbildung 4.18 B).

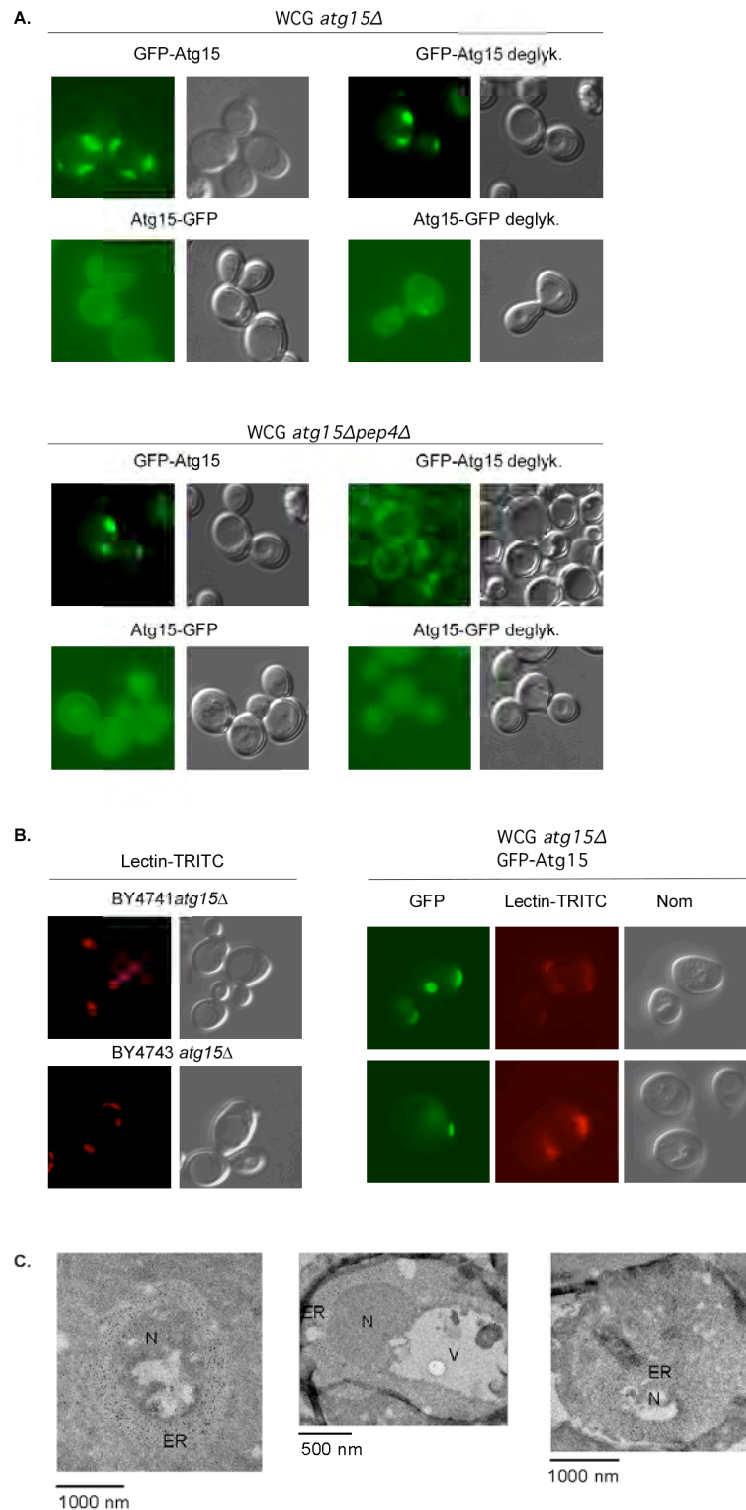


Abbildung 4.19: Überexpression von GFP-Atg15p führt zur ER-Proliferation. Die Induktion der Expression erfolgte in Selektionsmedium ohne Methionin. **A.** Gezeigt ist die Verteilung des GFP-Signals in WCG *atg15Δ* sowie WCG *atg15 pep4Δ*. **B.** Lokalisierung der Sprossnarben in haploiden (BY4741) und diploiden (BY4743) Zellen von *S. cerevisiae*. **C.** Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von GFP-Atg15p in WCG *atg15Δ* (Zusammenarbeit mit Dr. Wenzel, Göttingen).

4.2.2 Direkte Lokalisierung C-terminal verkürzter GFP-Atg15p-Konstrukten

Atg15p enthält das für Serin-Lipasen kennzeichnende Motiv G-X-S-X-G. Im aktiven Zentrum von Lipasen befinden sich neben dem Serin auch Histidin und Asparaginsäure. Beim Sequenzvergleich mit anderen Hefen finden sich mehrere konservierte Histidine und Asparaginsäuren im Anschluss an das Serin [107, 109].

4.2.2.1 Klonierung der Konstrukte

Ziel der nachfolgend beschriebenen Klonierung war die Erzeugung von drei C-terminal verkürzten *ATG15*-Konstrukten mit N-terminalem GFP unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors.

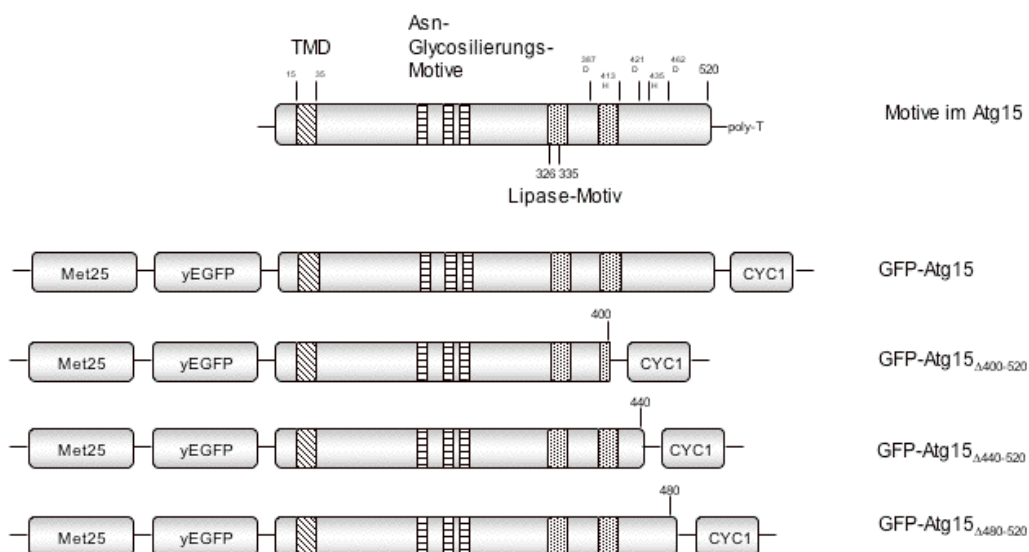


Abbildung 4.20: Übersicht der trunkierten Konstrukte von Atg15p mit N-terminalem GFP.

Mittels PCR (Abschnitt 3.2.4.11) wurden drei unterschiedlich lange GFP-*ATG15* Konstrukte erzeugt. Als Ausgangsplasmid diente dabei pUG36-GFP-Atg15 (Abbildung 4.17). Das Oligonucleotid TVRev465-525 wurde in allen drei Fällen als Reverse Oligonucleotid benutzt. Für das kürzeste Konstrukt, dem jeweils die zwei konservierten Aminosäuren Asparaginsäure (an Position 421 und 462) und Histidin (an Position 413 und 435) fehlten, wurde als Forward-Oligonucleotide TVfor1Δ400-

520 verwendet. Das Oligonucleotid TVfor2 Δ 440-520 ergab ein Konstrukt ohne die konservierte Aminosäure Asparaginsäure an Position 462. Das dritte Konstrukt wurde mittels des TVfor3 Δ 480-520-Oligonucleotides erzeugt. Die PCR-Produkte wurden zusammen mit dem mit *HindIII* und *SalI* geschnittenen Plasmid pUG36-GFP-*ATG15* in kompetente WCG *atg15* Δ -Hefezellen transformiert (Abschnitt 3.2.2). Die so über homologe Rekombination erzeugten Plasmide pUG36-GFP-*atg15* Δ 400-520, pUG36-GFP-*atg15* Δ 440-520 sowie pUG36-GFP-*atg15* Δ 480-520 wurden mittels Plasmid Rescue aus den Hefezellen isoliert (Abschnitt 3.2.3.2) und in den *E. coli* Stamm *DH5 α* transformiert (Abschnitt 3.2.4.4).

4.2.2.2 Überprüfung der biologischen Aktivität von verkürzten GFP-Atg15p-Konstrukten

Die Aktivität der erzeugten Konstrukte wurde zunächst in einem Vesikeltest überprüft. Abbildung 4.21 A zeigt den Vesikeltest in *atg15* Δ -Zellen (WCG-Hintergrund), die mit den in Abschnitt 4.2.2.1 beschriebenen Konstrukten transformiert wurden.

Die Expression des kürzesten Konstrukts (GFP-Atg15p Δ 400-520) führte zur Anreicherung von Vesikeln in der Vakuole. Das um 120 Aminosäuren trunkierte Atg15p komplementierte den Lysedefekt also nicht. Dies war auch in den mit pRS316 transformierten Kontrollzellen der Fall. Fehlten dem GFP-Fusionsprotein die letzten 80 Aminosäuren (GFP-Atg15p Δ 440-520), so fanden sich wenige Vesikel in der Vakuole. Im Falle des GFP-Atg15p Δ 440-480 war die Komplementation also nicht vollständig. Das längste der erzeugten Konstrukte (GFP-Atg15p Δ 480-520) komplementierte den Lysedefekt, es waren keine Vesikel in der Vakuole zu erkennen.

Weiterhin wurde die Aktivität anhand der Reifung der proApe1p überprüft. Die Ergebnisse für die Reifung von proApe1p waren mit denen des Vesikeltests vergleichbar, nur das längste Konstrukt GFP-Atg15p Δ 480-520 war in der Lage Ape1p-Vesikel zu lysieren und proApe1p zu reifen (Abbildung 4.21 B). Sowohl das Atg15p-Protein als auch das GFP-markierte Protein ließen sich nachweisen, die unterschiedliche Größe der Konstrukte war mit dem GFP-Antikörper detektierbar.

Die trunkierten Proteine lokalisierten ebenfalls in ringförmigen ER-Strukturen (Abbildung 4.21 C), so wie bereits für das Ausgangskonstrukt GFP-Atg15p beschrieben (Abbildung 4.19). Die Expression schien jedoch in den C-terminal verkürzten Konstrukten abzunehmen (Abbildung 4.21). Aufgrund der Pep4p-Aktivität in den Zellen konnte kein vakuoläres Signal in den Zellen gezeigt werden.

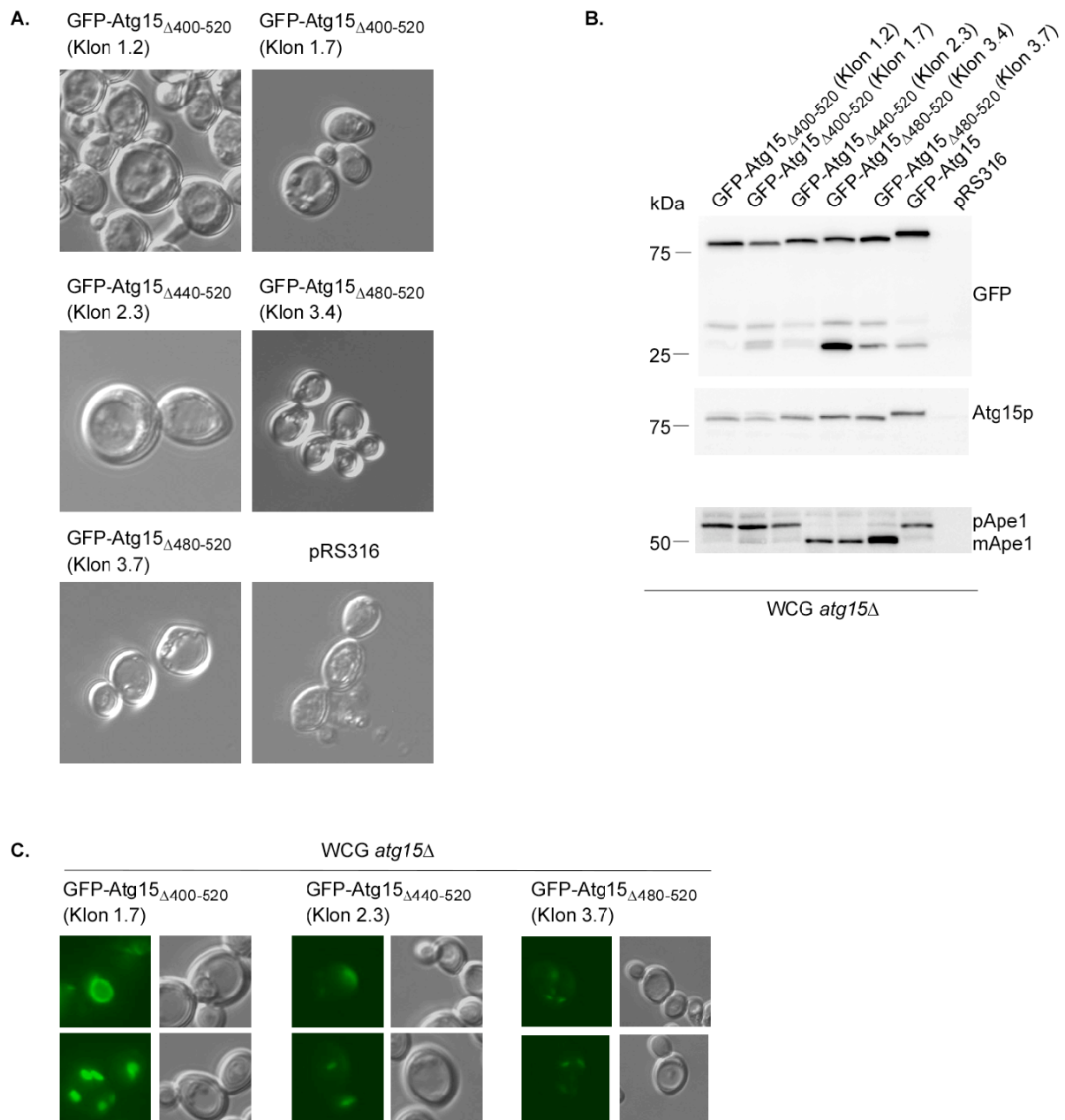


Abbildung 4.21: Aktivität und Lokalisierung der trunkierten Atg15p-Versionen. Induktion der Expression des Fusionsproteins in Selektionsmedium ohne Methionin **A.** Vesikeltest *atg15Δ*-Zellen (WCG-Hintergrund) nach 4 h Hungerung in SD(-N). **B.** Komplementationsanalyse der Konstrukte im WCG *atg15Δ* nach 4 h Inkubation in SD(-N). Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Antikörper gegen GFP, Atg15p und Ape1p. **C.** Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung der trunkierten Proteine im WCG *atg15Δ*.

4.2.3 Abhängigkeit der Atg15p-Aktivität vom Serin an Position 332

Atg15p enthält das aktive Zentrum einer Lipase im Bereich der Aminosäuren 326 bis 335 (Prosite-Zugangsnummer PS00120). Dieses potentielle Lipase-Motiv schließt ein aktives Serin an Position 332 ein.

4.2.3.1 Klonierung der Konstrukte

Ziel der Klonierung war es, mittels homologer Rekombination in Hefe ein Konstrukt zu erzeugen, in welchem das aktive Serin gegen ein Alanin ausgetauscht ist. Somit verliert Atg15p seine Aktivität.

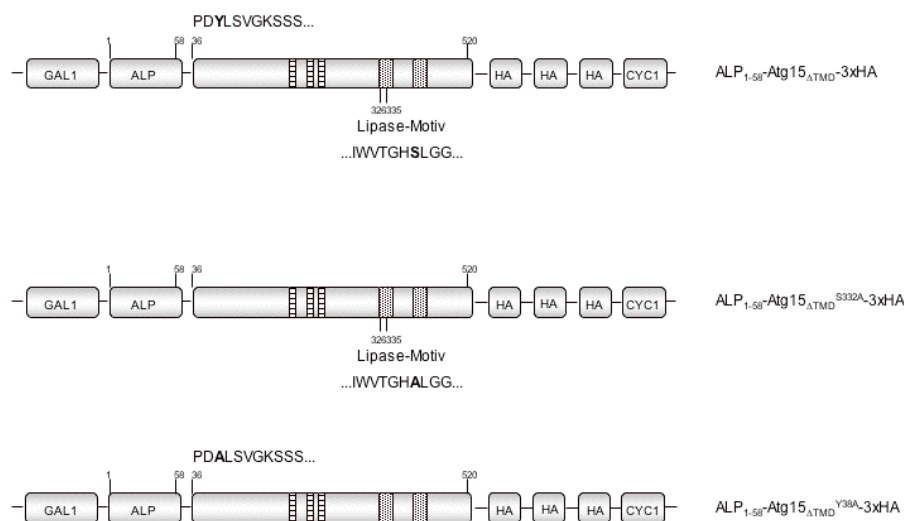


Abbildung 4.22: Übersicht der ALP-Atg15p-Konstrukte ohne Transmembrandomäne von Atg15. Dabei wurde zum einen das Serin an Position 332 gegen Alanin ausgetauscht (siehe Abschnitt 4.2.3). Zum anderen wurde das Tyrosin an Position 38 gegen Alanin ausgetauscht (siehe Abschnitt 4.2.4.2).

Als Ausgangsplasmid diente das Konstrukt pUE51 (pYES2-*alp*₁₋₅₈- *atg15*_{ΔTMD}-3xHA) mit einer Expression von Atg15p unter der Kontrolle des GAL1-Promotors. Das Konstrukt bestand aus dem cytosolischen Sortiersignal sowie der Transmembrandomäne der Alkalischen Phosphatase (ALP) *PHO8* und *ATG15* ohne die Transmembrandomäne. Das Plasmid wurde mit *MscI* linearisiert. In einer PCR (Abschnitt 3.2.4.11) mit den *ATG15*-spezifischen Oligonucleotiden Seq1 und Seq2 wurde ausgehend von dem Plasmid pUE21 (pRS315-*atg15*^{S332A}-3xHA) ein 422 bp langes Fragment amplifiziert, das den Austausch von Serin zu Alanin enthielt.

Anschließend wurde das PCR-Produkt zusammen mit dem linearisierten Vektor in kompetente WCG *atg15* Δ -Hefezellen transformiert (Abschnitt 3.2.2). Die Selektion erfolgte über Uracil. Das so erhaltenen Plasmid pYES2-*alp*₁₋₅₈-*atg15* Δ TMD^{S332A}-3xHA (Abbildung 4.22) wurde mittels Plasmid Rescue (Abschnitt 3.2.3.2) aus den Hefezellen isoliert und in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert (Abschnitt 3.2.4.4).

4.2.3.2 Das Serin in Position 332 ist für die biologische Aktivität von Atg15p essentiell

Abbildung 4.23 zeigt den Vesikeltest und die Ape1p-Reifung für das inaktive Atg15 Δ TMD^{S233A}-Konstrukt im Vergleich zum aktiven Ausgangskonstrukt und zum Kontrollplasmid.

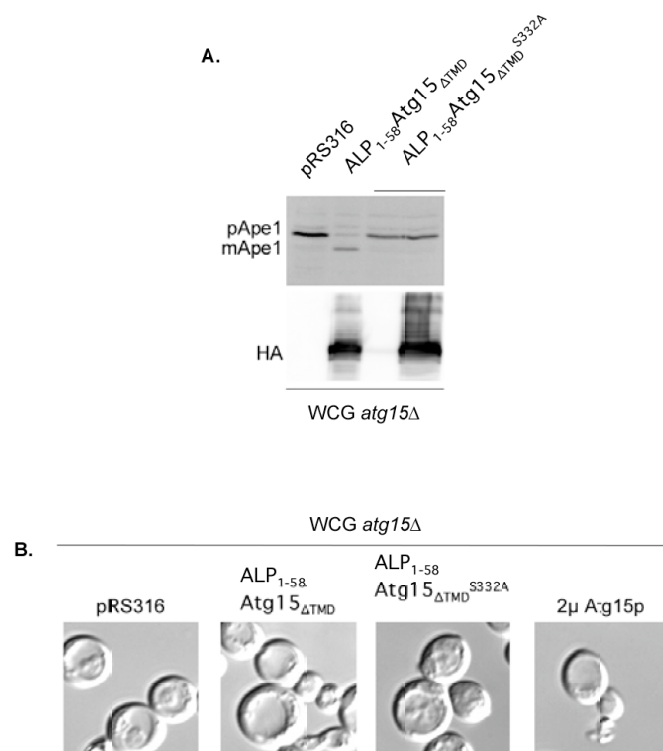


Abbildung 4.23: ALP-Atg15p Δ TMD ohne Serin 332 ist inaktiv. **A.** Nachweis der Ape1p-Reifung in *atg15* Δ -Zellen (WCG) und des Atg15-HA-Fusionsproteins. Für das Konstrukt mit dem S332A-Austausch sind zwei Klone untersucht, nur einer exprimiert das Fusionsprotein korrekt. **B.** Vesikeltest im WCG *atg15* Δ nach 4 h Hungerung in SD(-N). Als Negativkontrolle dient der leere Vektor pRS316, als Positivkontrolle Atg15p auf einem 2 μ -Überexpressionsplasmid.

Nur das Ausgangsprotein von Atg15p ohne Transmembrandomäne war nach Expression unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors in der Lage, proApe1p zu reifen und den Lysedefekt im Vesikeltest zu komplementieren. Die Abbildung 4.23 A zeigt

zwei inaktive Klone des Atg15p_{ΔTMD}^{S233A}-Konstruktes. In beiden Fällen wurde die proApe1p nicht mehr gereift. Nur in einem der Klone ließ sich wie im aktiven Protein die HA-Markierung des Fusionsproteins nachweisen. Daher wurde dieser Klon für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

4.2.3.3 ALP-Atg15p_{ΔTMD} hemmt das Zellwachstum

Für die nachfolgenden Experimente wurden die entsprechenden Deletionsstämme mit den Plasmiden pYES2-*alp*₁₋₅₈-*atg15*_{ΔTMD}^{S332A}-3xHA (inaktives Atg15p) bzw. pYES2-*alp*₁₋₅₈-*atg15*_{ΔTMD}-3xHA (aktives Atg15p) transformiert. Das leere pRS316-Plasmid diente als Negativ-Kontrolle. Ein überexprimierendes 2μ *ATG15*-Plasmid diente als Positivkontrolle für die Wirkung von Atg15p in den Deletionsstämmen. Die Zellen wurden zunächst über Nacht in Selektionsmedium mit 2 % Raffinose angezogen, eine Verdünnungsreihe in sechs Schritten von 1:10 bis 1:100000 hergestellt und 5 μl der jeweiligen Zellsuspension auf Selektionsplatten mit 2 % Glukose bzw. 2 % Galaktose aufgetropft. Von jedem Ansatz wurde eine Platte 2 bis 3 Tage bei 30°C und eine bei 37°C inkubiert. Die Expression von Atg15p_{ΔTMD} und Atg15p_{ΔTMD}^{S332A} erfolgte in Abhängigkeit vom *GAL1*-Promotor nur in Gegenwart von 2 % Galaktose.

Abbildung 4.24 zeigt die Lyse-defizienten Stämme *atg15Δ* und *atg15Δ pep4Δ* im WCG-Hintergrund. Beim Wachstum auf Glukose bei 30°C und 37°C wuchsen alle Zellen gleichmäßig. Auch beim Wachstum auf Galaktose bei 30°C und bei 37°C wuchsen die Kontrollen (pRS316 und 2μ Atg15p) in den *ATG15*- und *ATG15 PEP4*-defizienten Stämmen ohne Einschränkung.

Das aktive ALP-Atg15p_{ΔTMD}-Konstrukt führte bei 30°C in *atg15Δ pep4Δ*-Zellen zu schlechterem Wachstum als das inaktive ALP-Atg15p_{ΔTMD}^{S332A}-Konstrukt. Der Effekt wurde bei 37°C durch den zusätzlichen Temperaturstress noch verstärkt. Die Proteinase A (Pep4p) und B (Prb1p) sind notwendig für die Lyse von autophagischen Vesikeln in der Vakuole. Beide Proteine könnten an der Reifung von Atg15p beteiligt sein. Der Wachstumstest zeigte, dass ALP-Atg15p auch ohne Proteinase A aktiv ist.

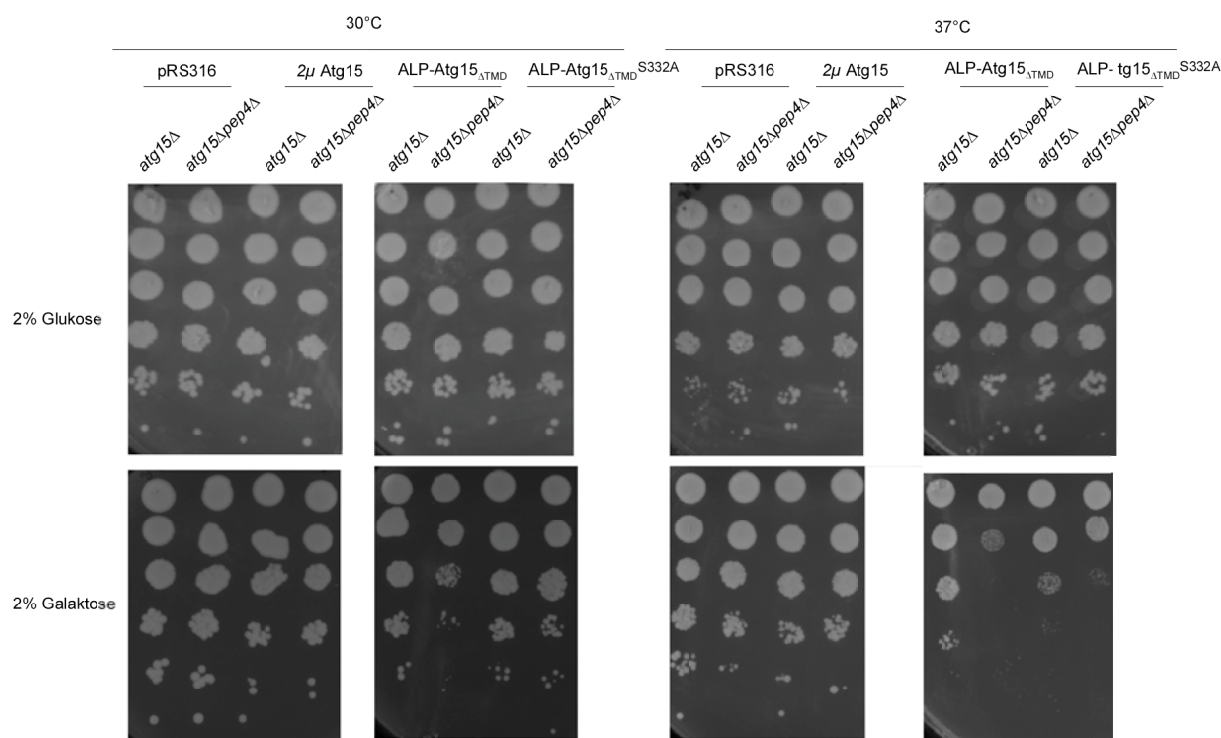


Abbildung 4.24: Wachstum nach Expression von ALP-Atg15p Δ TMD und ALP-Atg15p Δ TMD^{S332A} in *atg15* Δ und *atg15* Δ *pep4* Δ -Zellen. Nach Wachstum der Zellen in 2% Raffinose wurden Verdünnungsreihen auf Agarplatten mit Selektionsmedium mit 2% Glukose oder 2% Galaktose aufgetropft und bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

4.2.3.4 Autophagie ist am Abbau stark überexprimierter Proteine beteiligt

Abbildung 4.25 zeigt Deletionsstämme der Kinase *ATG1* und des E2-ähnlichen Enzyms *ATG3* in Kombination mit einer zusätzlichen Deletion von *PEP4*. Diese Stämme waren in der Induktion der Autophagie gestört. Außerdem fehlte ihnen Proteinase A, was zu einem zusätzlichen Lysedefekt führte.

Die transformierten Zellen wuchsen bei 30°C auf Glukose gleichmäßig, ebenso bei 37°C. Das Wachstum der Zellen auf Galaktose zeigte deutlich, dass die Überexpression von Atg15p Δ TMD und von Atg15p Δ TMD^{S332A} das Wachstum der Autophagie-defizienten *atg1* Δ und *atg1* Δ *pep4* Δ -Zellen, vor allem aber das der *atg3* Δ und *atg3* Δ *pep4* Δ -Zellen verlangsamte. Zellen mit dem aktiven ALP-Atg15p Δ TMD-Konstrukt wuchsen dabei noch etwas schlechter als die mit inaktiven ALP-Atg15p Δ TMD^{S332A}-Konstrukt. Im Vergleich zu den Lyse-defizienten Stämmen ist der Unterschied im Wachstum aber geringer. Ohne *ATG1* und *ATG3* konnten die Zellen die überexprimierten Proteine nicht mehr abbauen, was zu einem nachweisbaren

Wachstumsdefekt führte. Dieser wurde durch zusätzlichen Temperaturstress noch verstärkt.

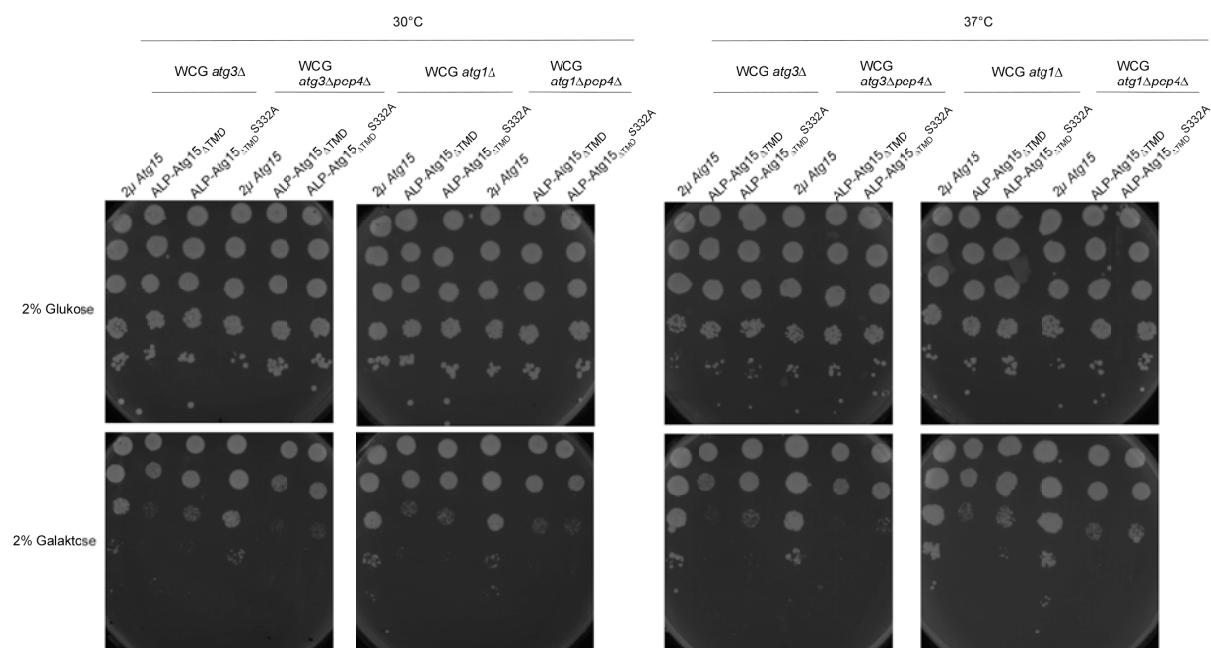


Abbildung 4.25: Wachstumssphänotypen von ALP-Atg15p_{ΔTMD} und ALP-Atg15p_{ΔTMD}^{S332A} in Autophagie-defizienten Stämmen des WCG-Hintergrundes. Nach Wachstum der Zellen in 2% Raffinose wurden Verdünnungsreihen auf Agarplatten mit Selektionsmedium mit 2% Glukose oder 2% Galaktose aufgetropft und bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

4.2.3.5 ALP-Atg15p hat keinen Einfluss auf *APM3*-defiziente Zellen

Die *APM3*-defizienten Zellen in Abbildung 4.26 bilden keine ALP-Vesikel mehr aus, in diesen Zellen sollten die Konstrukte nicht mehr an die vakuoläre Membran gelangen [23]. Das Wachstum der Zellen war bei 30°C auf Glukose nicht beeinträchtigt. Nach der Induktion des *GAL1*-Promotors zeigte sich, dass sowohl die Wildtyp-Zellen als auch die *pep4Δ*-Zellen bei 30°C sowie bei 37°C durch die Expression von aktivem ALP-Atg15p_{ΔTMD} schlechter wachsen. In *apm3Δ*-Zellen zeigte sich keine Verschlechterung des Wachstums durch die Expression der Fusionsproteine.

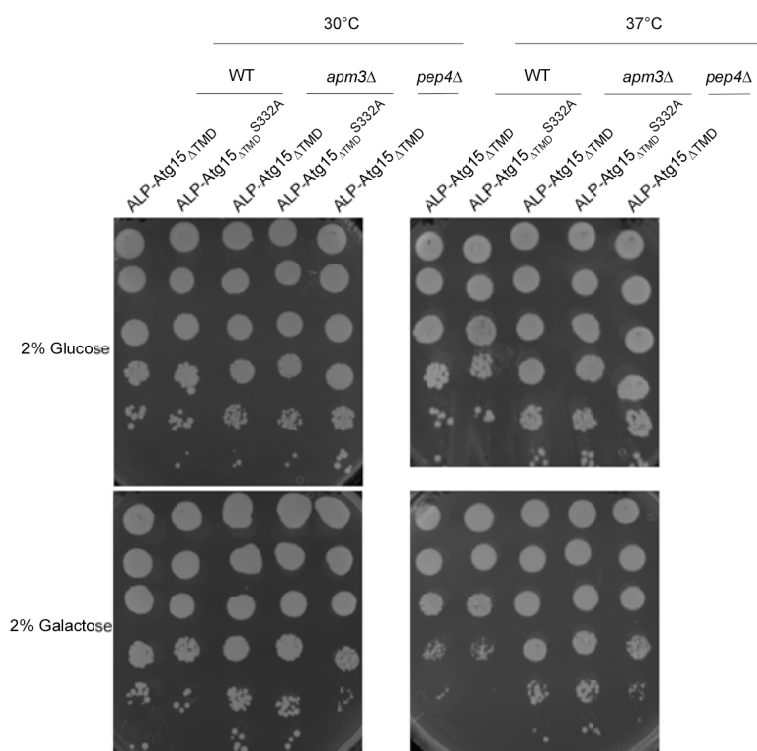


Abbildung 4.26: Die Expression von ALP-Atg15p Δ TMD erzeugt keinen nachweisbaren Wachstumsphänotyp in *APM3*-defizienten Zellen. Stämme des BY4741-Hintergrundes. Nach Wachstum der Zellen in 2% Raffinose wurden Verdünnungsreihen auf Agarplatten mit Selektionsmedium mit 2% Glukose oder 2% Galaktose aufgetropft und bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

4.2.3.6 Die Überexpression von ALP-Atg15p Δ TMD und ALP-Atg15p Δ TMD^{S332A} ist in *vps11* Δ -Zellen letal

Vps11p gehört zu den so genannten HOPS / Klasse C Proteinen. Fehlt *VPS11*, erfolgt keine Fusion von ALP-Vesikeln oder des späten Endosoms mehr mit der Vakuole.

Der schädigende Einfluss von ALP-Atg15p Δ TMD auf das Wachstum von *VPS11*-defizienten Zellen zeigte sich in den hier durchgeführten Untersuchungen bereits bei 30°C auf Glukose und wird bei 37°C noch verstärkt (Abbildung 4.27). Eine Überexpression des aktiven ALP-Atg15p Δ TMD ist bei 30°C im *vps11* Δ letal, bei 37°C auch für das inaktive ALP-Atg15p Δ TMD^{S332A}.

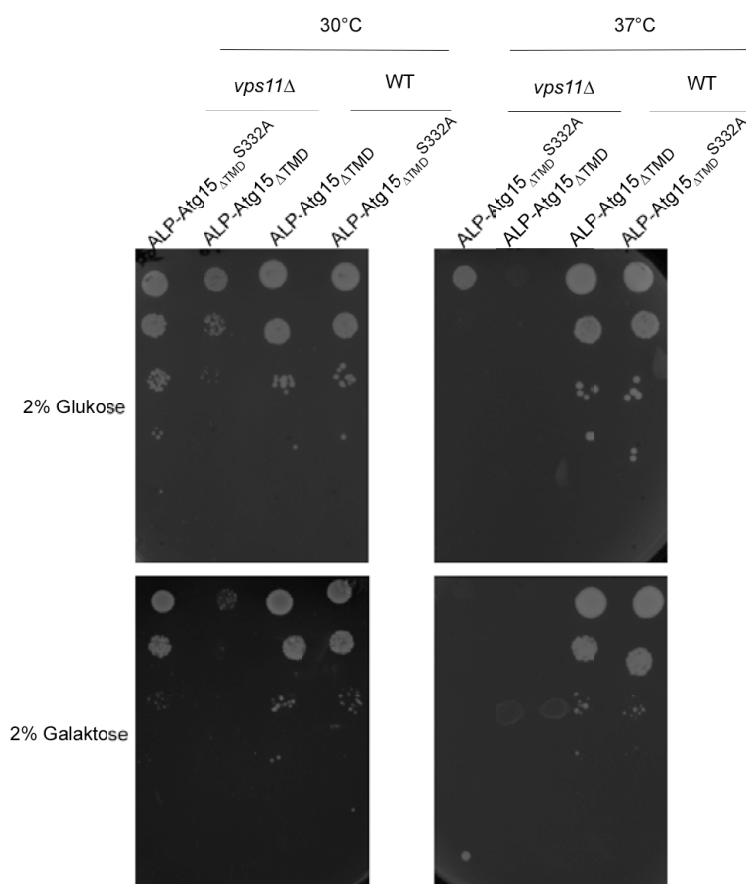


Abbildung 4.27: ALP-Atg15 Δ TMD verlangsamt das Wachstum von *vps11Δ*-Deletionstämmen und ist bei Überexpression letal. Stämme des BY4741-Hintergrundes. Nach Wachstum der Zellen in 2% Raffinose wurden Verdünnungsreihen auf Agarplatten mit Selektionsmedium mit 2% Glukose oder 2% Galaktose aufgetropft und bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

4.2.4 Transport von Sna3p und Atg15p im MVB-Weg

Der MBV-Weg ist Teil des endosomales System und dient unter anderem dem Ubiquitin-abhängigen Transport einiger Transmembranproteine zum Lysosom (Vakuole) [165]. Auch die Proteine Atg15p und Sna3p werden über den MVB-Weg transportiert. Für Sna3p wurde zunächst gezeigt, dass es Ubiquitin-unabhängig über den MVB-Weg transportiert wird [12]. Inzwischen wurde eine Interaktion der Ubiquitin-Ligase Rsp5p mit Sna3p nachgewiesen, welche auf einem PPAY-Motiv beruht [16]; [17]. Die direkte Ubiquitinierung von Sna3p ist nicht zwingend erforderlich, unterstützt aber den Transport [17]. Ein PxY-Motiv findet sich auch hinter der Transmembrandomäne von Atg15p. In den nachfolgenden Experimenten wurde der Transport von Atg15p über den MVB-Weg mit dem von Sna3p verglichen und eine mögliche Ubiquitinierung des Proteins näher untersucht.

4.2.4.1 Der Transport von Sna3p erfolgt unabhängig von dem Lysin an Position 125

Sna3p besitzt an Position 125 ein Lysin, an dem eine Ubiquitinierung vorausgesagt wird [166]; [167]. Dieses Lysin wurde mittels zielgerichteter Mutagenese durch ein Arginin ersetzt. Dazu wurde das *QuikChange®II Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) verwendet (Abschnitt 3.2.4.14). Als Ausgangsplasmid diente dabei pRS416-SNA3-GFP [12]. Als Mutagenese-Oligonucleotide wurden Sna3mutfor und Sna3mutrev verwendet. Die PCR, der anschließende *DpnI*-Verdau sowie die Transformation in kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Das so erzeugte Konstrukt pRS416-*sna3*^{K125R}-GFP wurde durch Sequenzierung überprüft.

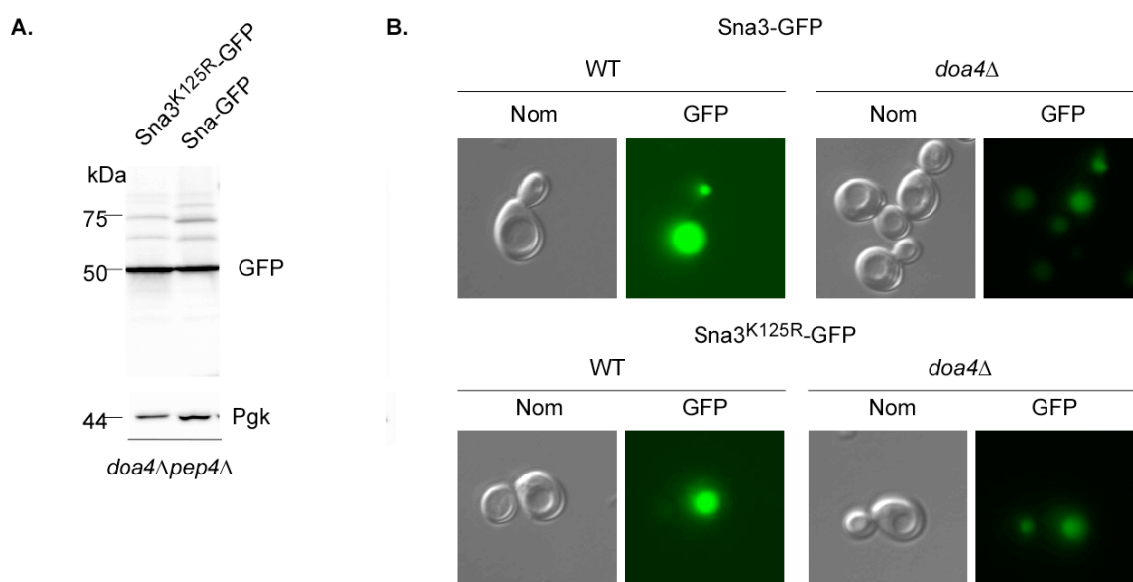


Abbildung 4.28: Ubiquitinierungsmuster und Lokalisation von Sna3p^{K125R} **A.** Nachweis der Ubiquitinierung in Sna3p und Sna3p^{K125R} mit GFP-Antikörper in *doa4Δ pep4Δ*-Zellen des MHY-Hintergrundes. Der Nachweis von Pgk diente als Ladekontrolle. **B.** Mikroskopische Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine in Wildtypzellen und *doa4Δ*-Zellen des MHY-Hintergrundes.

Doa4p ist eine AAA-Typ ATPase und notwendig für das Ubiquitin-Recycling in der Zelle. Fehlt das Protein, sind Ubiquitin-abhängige Prozesse in der Zelle verlangsamt oder blockiert [7].

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden Zellen verwendet, in denen neben *DOA4* auch die vakuoläre Proteinase A (*PEP4*) deletiert ist. Die Zellen stabilisierten daher die exprimierten GFP-Sna3-Konstrukte sowie ihre Ubiquitin-Konjugate. Eine

Mutation des Lysins in Position 125 des Sna3-GFP führte zu einem veränderten Ubiquitinierungsmuster (Abbildung 4.28 A).

Abbildung 4.28 B zeigt, dass beide Konstrukte sowohl in Wildtypzellen als auch in *DOA4*-defizienten Zellen in die Vakuole transportiert wurden. Dabei ist das Signal in den *doa4Δ*-Zellen etwas schwächer als im Wildtyp. Folglich verändert der Austausch von Lysin in Position 125 zu Arginin das Ubiquitinierungsmuster, aber nicht die Lokalisation von Sna3p.

4.2.4. Untersuchungen zur Ubiquitinierung von Atg15p und dem Einfluss des PxY-Motivs auf die Atg15p-Sortierung

Frühere Untersuchungen zeigten, dass der Transport von Atg15p nicht abhängig von Tul1p und Doa4p ist und damit wie für Sna3p Ubiquitin-unabhängig erfolgte [109]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde nochmals eine mögliche Ubiquitinierung von Atg15p überprüft und durch Mutagenese des PxY-Motivs in der Nähe der Transmembrandomäne dessen Funktion für den Transport überprüft.

Dazu wurde das Tyrosin an Position 38 in dem Motiv gegen ein Alanin mittels zielgerichteter Mutagenese unter Verwendung des *QuikChange® II Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) ausgetauscht (Abschnitt 3.2.4.14). Als Ausgangsplasmide dienten dabei pUE13 (*CEN* pRS316-*ATG15*-3xHA) mit dem nativen *ATG15*-Promotor sowie pUE51 (pYES2-ALP₁₋₅₈-*atg15*_{ΔTMD}-3xHA) unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Als Mutagenese-Oligonucleotide für pUE13 dienten die Oligonucleotide Y/A-*ATG15*-HAfor und Y/A-*ATG15*-HArev. Für pUE51 wurden die Mutagenese-Oligonucleotide Y/A-ALP-*ATG15*for sowie Y/A-ALP-*ATG15*rev verwendet. Die PCR, der anschließende *DpnI*-Verdau sowie die Transformation in kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Die so erzeugten Konstrukte pRS316-*atg15*^{Y38A}-3xHA (*CEN*) und pYES2-ALP₁₋₅₈-*atg15*_{ΔTMD}^{Y38A}-3xHA wurden durch Sequenzierung überprüft.

4.2.4.3 Atg15p-HA ist nicht ubiquitiniert und auch ohne PxY-Motiv biologisch aktiv

Um zu überprüfen, ob Atg15p ubiquitiniert wird, wurden verschiedene Atg15p-HA-Konstrukte in *doa4Δ*- und *doa4Δ pep4Δ*-Zellen exprimiert (Abbildung 4.29 A). Um einen möglichen Einfluss der aminoterminalen, cytosolischen Domäne zu überprüfen, wurde neben den N- und C-terminal HA-markierten Proteinen auch ein Atg15-Konstrukt untersucht, dem diese Domäne fehlt (Atg15p_{Δ2-12}). In Abbildung 4.29 A ist, anders als für Sna3p (siehe. Abbildung 4.28) keine Ubiquitinierung der Atg15p-Konstrukte zu erkennen. Es zeigt sich nur das bereits beschriebene Glykosilierungsmuster von Atg15p [107].

Nach der Mutagenese des PxY-Motivs in Atg15p durch Austausch eines Tyrosins an Position 38 gegen Alanin sollte zunächst die biologische Aktivität der so erzeugten Konstrukte überprüft werden. Dazu wurde die Ape1p-Reifung in Lyse-defizienten *atg15Δ*-Zellen untersucht (Abbildung 4.29 B).

Das Atg15p-HA-Konstrukt mit endogenem Promotor und die entsprechende mutagenisierte Form zeigen eine normale Reifung von proApe1p. Dies gilt auch für die ALP-Atg15p-HA-Konstrukte, die unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors exprimiert werden. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch einen Vesikeltest mit *atg15Δ*-Zellen bestätigt werden. Nach vierstündiger Hungerung der transformierten Zellen in SD(-N) befanden sich keine autophagischen Vesikel in der Vakuole. Die Zellen, die zur Kontrolle mit dem Ausgangsvektor transformiert wurden, akkumulieren hingegen Vesikel.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die durch *in vitro*-Mutagenese erhaltenen Konstrukte, wie ihre Ausgangskonstrukte, biologisch aktiv waren.

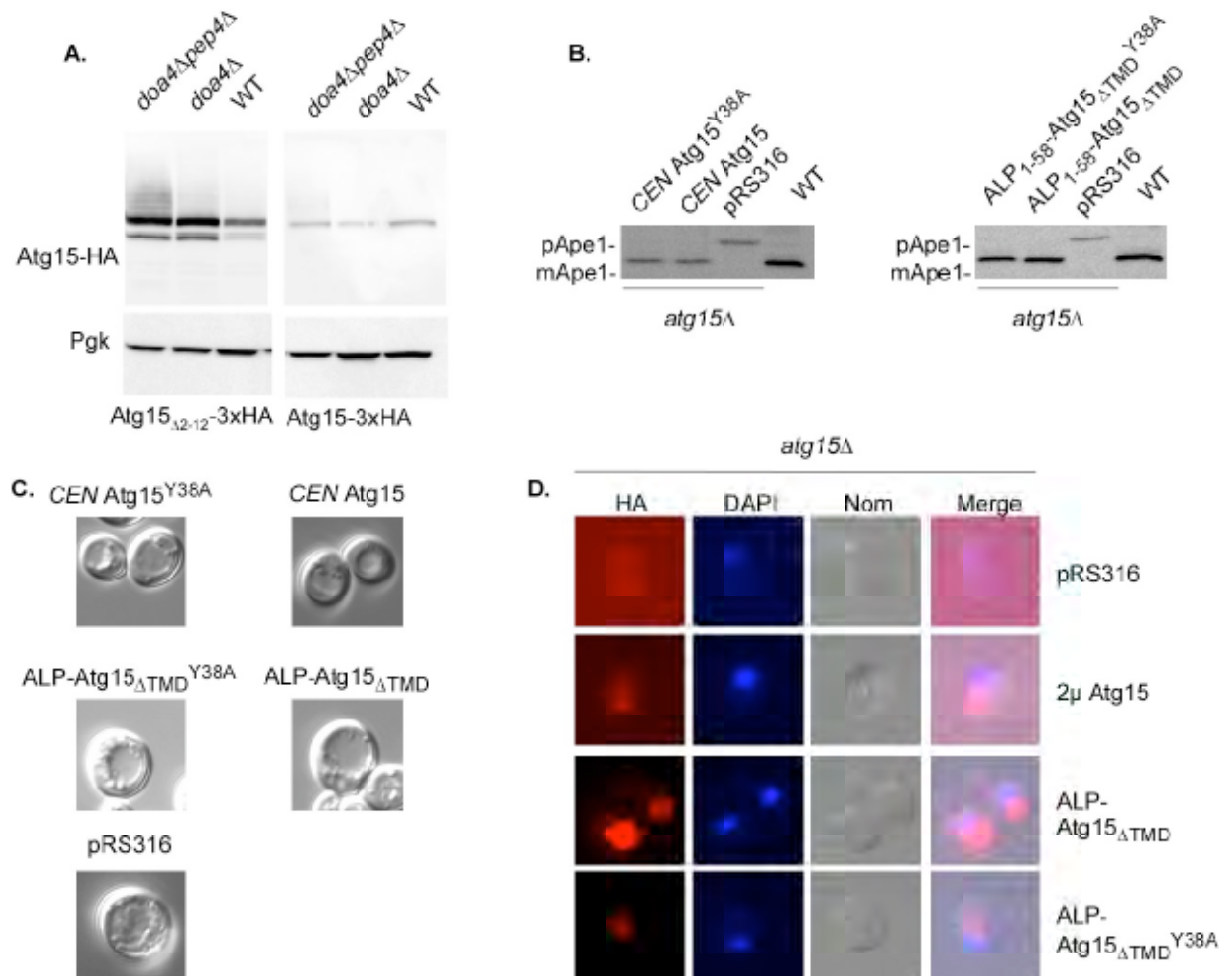


Abbildung 4.29: A. Atg15p-HA wird nicht ubiquitiniert. Weder das Wildtyp Atg15p mit HA-Tag noch Atg15p ohne die Aminosäuren 2-12 mit HA-Tag zeigen eine charakteristische Ubiquitinierung in Zellen des MHY-Hintergrundes. Der Pgk-Nachweis diente als Ladekontrolle. **B. Atg15p^{Y38A} ist biologisch aktiv.** Ape1p-Reifung in stationären *atg15Δ*-Zellen im WCG-Hintergrund. Als Negativkontrolle wurde Proteinextrakt aus pRS316-transformierten Zellen verwendet, als Positivkontrolle Proteinextrakt aus Wildtypzellen. **C. Vesikeltest in WCG *atg15Δ* nach 4 h Hungerung in SD(-N).** **D. Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von ALP₁₋₅₈Atg15p^{Y38A} in WCG *atg15Δ*.** Indirekte Immunfluoreszenz nach 4 h Inkubation in SD(-N). **A.-D.** Das Wachstum der Zellen erfolgte in Selektionsmedium mit 2 % Glukose; bei den Konstrukten mit *GAL1*-Promotor erfolgte das Zellwachstum zunächst in 2 % Raffinose, dann über Nacht in 2 % Galaktose.

Ein Ziel der Untersuchungen war es zu testen, ob Atg15p ohne das PxY-Motiv in der Zelle mislokalisiert wird. Dazu wurden die durch *in vitro*-Mutagenese erhaltenen Konstrukte, sowie deren Ausgangskonstrukte und als Kontrolle pRS316 in *atg15Δ pep4Δ*-Zellen des WCG-Hintergrundes transformiert. Die Lokalisierung erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.2.5.4).

Es ist bekannt, dass Atg15p-HA an 50 nm großen, intravakuolären MVB-Vesikeln und am ER lokalisiert ist [107]. In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen des mutagenisierten Konstruktes Atg15p^{Y38A}-HA zeigten eine diffusere Verteilung des Signals (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine Funktion des PxY-Motivs für die Sortierung von Atg15p im MVB-Weg hinweisen, die vergleichbar mit Sna3p ist. Im

Rahmen dieser Arbeit konnte die Lokalisierung von Atg15p mit mutagenisiertem PxY-Motiv jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

Die Ergebnisse für das in Kapitel 4.2.3 beschriebene ALP₁₋₅₈-Atg15p-Konstrukt sowie des mutagenisierten Konstruktes ALP₁₋₅₈Atg15p^{Y38A}-HA zeigten die erwartete Lokalisierung beider Konstrukte an der Vakuolenmembran. Das Fusionsprotein wird in beiden Fällen in Abhängigkeit von der aminoterminalen ALP-Domäne und nicht über den endosomalen Weg sortiert.

5. DISKUSSION

5.1 Mikroautophagischer Abbau des Kern-ER in *Saccharomyces cerevisiae*

Autophagie dient eukaryotischen Zellen bei Nährstoffmangel als Transportmechanismus für cytosolische Proteine oder ganze Organellen in das Lysosom bzw. in die Vakuole [168], um daraus lebensnotwendige Aminosäuren zu gewinnen. Es lassen sich zwei Formen der Autophagie unterscheiden: Makroautophagie, gekennzeichnet durch doppelmembranlagige Transportvesikel (Autophagosomen), und Mikroautophagie, gekennzeichnet durch eine direkte Einstülpung der Vakuolen- oder Lysosomenmembran.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher vor allem makroautophagische Prozesse beschrieben [85]. Der stückweise Abbau von Kern-ER und Teilen des Zellkerns (piecemeal microautophagy of the nucleus, PMN) ist ein typischer mikroautophagischer Prozess. In *S. cerevisiae* existieren Kontaktstellen zwischen dem Kern-ER und der Vakuole, die durch direkte Wechselwirkung von Nvj1p am Kern-ER und dem vakuolären Protein Vac8p gebildet werden [123]. Bei Nährstoffmangel entstehen an den Kontaktstellen verstärkt Einstülpungen der vakuolären Membran. Aus morphologischer Sicht entstehen also mikroautophagische Vesikel, die in der Vakuole abgebaut werden.

Untersuchungen mit überexprimierten Markerproteinen sprachen zunächst gegen eine generelle Beteiligung von Komponenten der Makroautophagie an PMN. So wurde behauptet, dass in *atg7Δ* Zellen PMN ungestört abläuft [128, 142], [119]. Atg7p ist essentiell für die beiden Ubiquitin-ähnlichen Proteinkonjugationssysteme der Makroautophagie. Mit Atg7p wurde in diesen Arbeiten nur eine Komponente der Autophagie auf ihre Mitwirkung an PMN getestet. Aus diesem Grund wurden in der hier vorliegenden Arbeit weitere Proteine der Makroautophagie auf eine mögliche Beteiligung an PMN untersucht.

Als Markerprotein diene dabei GFP-markiertes Osh1p. Es gelangt nach der Induktion von Autophagie zusammen mit dem PMN-Markerprotein Nvj1p in die Vakuole und wird dort abgebaut. Die Messung des GFP-Osh1p-Abbaus erlaubt somit eine quantitative Verfolgung des Prozesses. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass neben der Lyse der PMN-Vesikel auch ihre Entstehung abhängig ist von Genen, die nicht nur für Makroautophagie sondern auch für den Cvt-Weg benötigt werden.

Bei der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit zeigen sich wesentliche Unterschiede zu den von der Arbeitsgruppe von D. S. Goldfarb publizierten Daten. Diese Unterschiede beruhen auf der Expressionsrate des verwendeten Markerproteins und der quantitativen Beurteilung der Daten.

In dieser Arbeit wurde die Freisetzung von GFP aus GFP-Osh1p als Maß für die Beteiligung eines Proteins an PMN herangezogen. Konnte nach der Expression des Markerproteins in dem Deletionsstamm des zu untersuchenden Gens kein freies GFP nachgewiesen werden, ist das entsprechende Protein an PMN beteiligt. Das freie GFP kann nur vakuolär entstehen.

Goldfarb *et al.* verwenden hingegen für ihre Untersuchungen oft überexprimierte Markerproteine wie zum Beispiel Nvj1-GFP, exprimiert unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde stets die Abnahme des Fusionsproteins wie Nvj1p-GFP untersucht, eine mögliche Freisetzung des Lyseproduktes GFP wurde jedoch nicht gezeigt.

Für *atg7Δ*-Zellen wurde aus der Abnahme des Signals für das überexprimierte Fusionsprotein Nvj1p-GFP geschlossen, dass die Atg-Proteine nicht an PMN beteiligt sind. Insbesondere für *ATG7*-defiziente Zellen sollte daher geprüft werden, ob bei Verwendung überexprimierter PMN-Markerproteine auch freies GFP nach der Autophagie-Induktion gezeigt werden kann. Die Abnahme des Fusionsproteins wie im Falle von *atg7Δ* [123], [142] könnte auch auf einem Abbau der stark überexprimierten Proteine z.B. durch das Proteasom beruhen. Zur Aufklärung dieses Effektes stehen verschiedene Mutanten des proteasomalen Abbaus von Proteinen zur Verfügung.

Die von Kvam *et al.* publizierten Experimente mit PMN-Proteinen unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors [142] ließen sich im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduzieren. Daher zeigen die hier vorliegenden Daten nur eine Wiederholung der Experimente

nach Überexpression unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors. Eine reproduzierbare Abnahme der Menge dieses Fusionsproteins konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Nur in Wildtypzellen konnte ein Nachweis von freiem GFP erfolgen. Es reichten bereits geringe Mengen an Kupfersulfat aus, um eine starke Expression des Proteins zu erreichen.

Das in dieser Arbeit verwendete Markerprotein GFP-Osh1p wird im Vergleich dazu nur gering exprimiert. Das Fusionsprotein GFP-Osh1p hat ein sehr hohes Molekulargewicht und war unter den hier gewählten Versuchsbedingungen schlecht nachzuweisen.

Zukünftig sind weitere Experimente geplant. Es gibt kommerziell erhältliche Hefestämme, die chromosomal Osh1-GFP und Tsc13-GFP exprimieren. Erste Untersuchungen mit Osh1p-GFP und Tsc13p-GFP zeigten, dass vor allem das letztere ein gut nachweisbares GFP-Signal im Western Blot ergibt (Daten nicht gezeigt). In diesem Stamm wurden daher Deletionen von *ATG7* und zur Kontrolle auch von *NVJ1* und *VAC8* durchgeführt. Die Arbeiten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden. Sie sollen die gefundenen Ergebnisse weiter bestätigen.

Ziel dieser Arbeit war es, Einblick in den molekularen Mechanismus der PMN zu gewinnen. Hierzu sollten an PMN beteiligte Gene identifiziert werden. Von den 31 bisher bekannten *ATG*-Genen sind die meisten an der Bildung der Autophagosomen beteiligt. Diese zentrale Maschinerie lässt sich in drei funktionelle Gruppen einteilen. Dazu gehört zum einen das Transmembranprotein Atg9p [169], die Wechselwirkungspartner aus dem Atg1p-Kinasekomplex, Atg2p und Atg18p. Zum anderen ist der PtdIns(3)P-Komplex beteiligt [170]. Schließlich kann auch das Ubiquitin-ähnliche Proteinkonjugationssystem dazu gezählt werden. Es enthält unter anderem die zwei Ubiquitin-ähnlichen Proteinen Atg8p und Atg12p und das E1-ähnliche Atg7p. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass diese zentralen Autophagieproteine für PMN benötigt werden (Abbildungen 4.2, 4.5 und 4.6).

Es gibt einen Transport von Atg9p zwischen dem PAS, dem Ort der Autophagosomen-Biogenese und einem peripheren Ort [171]. Atg23p und Atg27p (Etf1p) sind an diesem Transport beteiligt, werden aber für PMN nicht benötigt [172],

[102], [173]. Beide Proteine spielen nur eine Rolle im Cvt-Weg, für Makroautophagie werden sie nicht benötigt.

Atg17p, das im Atg1p-Kinasekomplex als Plattform für die Bindung weiterer Proteine dient, ist spezifisch für die hungerinduzierte Autophagie [144], [88]. Es ist an PMN beteiligt. Im Cvt-Weg interagiert Atg11p mit Atg1p [89]. Das Protein Atg11p ist ausschließlich am Cvt-Weg beteiligt. Es bindet den Ape1p-Rezeptor Atg19p, der keine Funktion für PMN hat. Atg11p wirkt bei der Vesikelbildung als Adapter und wird ebenfalls für PMN gebraucht. Die Beteiligung dieser Cvt-Komponenten zeigt, dass bei der Analyse des Markerproteins GFP-Osh1p keine unspezifische autophagische Degradation gemessen wurde, da rein makroautophagische Prozesse in diesen Deletionsmutanten weiterlaufen. Der Abbau von GFP-Osh1p über PMN, gemessen anhand der Zunahme an freiem GFP, benötigt nicht den eigentlichen Cvt-Weg, wohl aber bestimmte Komponenten.

Dies zeigt sich auch an Proteinen, die neben ihrer Beteiligung am Cvt-Weg eine Funktion bei Membranfusionen im sekretorischen Proteintransportweg aufweisen (Abschnitt 4.1.5), z.B. die Komponenten des GARP/VFT-Komplexes.

Deletionen der Gene des GARP-Komplexes haben zur Folge, dass proApe1p in den Zellen unter konstitutiven Wachstumsbedingungen nicht mehr gereift wird. Der Komplex ist neben der Bildung von Cvt-Vesikeln auch an Fusionsprozessen am späten Golgi und am Endosom beteiligt [156], [46], [155]. Für PMN hat der GARP-Komplex keine Funktion.

Atg20p und Atg24p, die bei der Bildung der Cvt-Vesikel am Atg1p-Kinasekomplex lokalisiert sind, finden sich als Sorting Nexine auch beim retrograden Transport vom frühen Endosom zum Golgi [153]. Atg20p ist nicht an dem in dieser Arbeit untersuchten PMN-Prozess beteiligt, in *ATG24*-defizienten Stämmen ist dagegen nur wenig freies GFP detektierbar.

Bei den untersuchten Komponenten des TRAPP-Komplexes zeigte nur Trs85p eine Beteiligung am Abbau von GFP-Osh1. Trs85p (Gsg1p) wird für die Organisation des PAS während des Cvt-Weges benötigt [154]. In *TRS85*-defizienten Stämmen gelangt Atg8p nicht mehr in die Vakuole [174].

Der Abbau von GFP-Osh1p benötigt PtdIns(3)P. Fehlt *ATG14*, das spezifisch ist für den an der Autophagie beteiligten Vps34-Komplex, ist dieser Abbau blockiert.

Atg18p, Atg21p und Hsv2p (Ygr223c) gehören zu einer konservierten sequenzhomologen Proteinfamilie, haben jedoch in *S. cerevisiae* unterschiedliche Funktionen. Alle drei Proteine enthalten je sieben WD-40 Domänen, die zu einem 7-blättrigen Propeller gefaltet sind. Diese Struktur kann als Plattform für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen dienen. Über ein FRRG-Motiv können Atg18p, Atg21p und Hsv2p an PtdIns(3)P sowie an PtdIns(3,5)P₂ binden [91].

Krick *et al.* konnten zeigen, dass ein mutiertes Atg18-FTTG Protein kaum mehr an PtdIns(3)P und an PtdIns(3,5)P₂ bindet, dabei seine Funktion für den Cvt-Weg verliert, die Funktion während der Autophagie jedoch nicht betroffen ist [137]. Eine Deletion von *ATG18* führt zur Blockierung von PMN. Diese Blockierung kann durch Transformation von Atg18p mit der FTTG-Bindestelle aufgehoben werden (Abbildung 4.7). Dies gilt auch für die Transformation eines Atg18p-HA mit mutierter FRRG-Bindestelle. Da auch das PtdIns(3,5)P₂-bindende Enzym Fab1p nicht für PMN benötigt wird hängt die Funktion von Atg18p während PMN auch nicht von der Bindung an PtdIns(3,5)P₂ ab. Auch hier zeigt sich die Relevanz von PtdIns(3)P für PMN. Atg18p scheint während PMN eine ähnliche Funktion zu haben wie im Verlauf der Autophagosomen-Bildung. Dabei könnte es sich um eine strukturgebende Funktion wie z.B. für die Rekrutierung von weiteren beteiligten Proteinen handeln.

Bei einer Deletion von *ATG21* entspricht die Abbaurate von GFP-Osh1p nur noch dem Hintergrund der *nvj1Δ*-Zellen. Auch das für den Cvt-Weg benötigte Atg21p wird also für PMN gebraucht. Anders als im Fall von Atg18p ist aber das FRRG-Motiv notwendig (Abbildung 4.7). Der Abbau von GFP-Osh1p während PMN wird durch die Bindung von PtdIns(3)P an Atg21p verbessert. Dies entspricht auch den Ergebnissen für den Ablauf des Cvt-Weges [137], der die Lipidbindung über das FRRG-Motiv benötigt. Atg21p ist direkt an der Organisation des PAS beteiligt, gezeigt durch die fehlende Anreicherung von GFP-Atg8p am PAS [175]. Während PMN besitzen beide Proteine trotz ihrer Homologie unterschiedliche Funktionen.

Das dritte Homolog Hsv2p (Ygr233c) ist weder an der Autophagie, noch am Cvt-Weg beteiligt. Es wird aber für PMN benötigt. Bisher ist wenig über das Protein bekannt. Hier konnte zum ersten Mal eine Funktion für Hsv2p in einem autophagischen Prozess gezeigt werden.

Viele der bisher genannten, zentralen Atg-Proteine finden sich zusammen mit der so genannten autophagischen Isolationsmembran am PAS. Dabei handelt es sich um

eine Struktur, von der ausgehend die Bildung der Autophagosomen und Cvt-Vesikel erfolgt [68]. Auch für PMN scheint das PAS notwendig zu sein. Neben den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen mittels Western Blot wurden erste fluoreszenzmikroskopische Colokalisierungs-Experimente mit den PAS-Markern Ape1p-RFP und RFP-Atg9p zusammen mit GFP-Osh1p durchgeführt. Eine eindeutige Colokalisierung der Proteine an den Kontaktstellen von Kern und Vakuole ließ sich aufgrund des schwachen Fluoreszenzsignals nicht nachweisen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten die Lokalisierung von GFP-Atg8p während PMN zeigen.

Die Lyse von PMN-Vesikeln benötigt die Proteinase A [142], [123]. Untersuchungen des Abbaus von GFP-Osh1p konnten dies bestätigen und darüber hinaus auch eine Beteiligung von Atg15p an dem Abbau von GFP-Osh1p zeigen. Atg22p und Prb1p scheinen nicht zwingend erforderlich zu sein, da in den entsprechenden Deletionsstämmen der Abbau reduziert, aber noch vorhanden war.

Bisher konnte nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ob während PMN frei bewegliche Vesikel in der Vakuole entstehen oder ob es sich bei den gezeigten Strukturen um schlauchförmige Einstülpungen der Vakuolenmembran handelt. Diese werden in Proteinase A-defizienten Stämmen während der Mikroautophagie beschrieben [176]. Hier wären weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen hilfreich. In Lyse-defizienten Stämmen könnte außerdem eine Verteilung des PMN-Markerproteins GFP-Osh1p im Dichtegradienten zeigen, ob sie sich in einer Vesikelfraktion nachweisen lassen.

Während PMN erfolgen zwei Membranfusionen. Zunächst fusionieren die Membranen des ER und anschließend die der Vakuole. Das p97-Homolog Cdc48p ist eine AAA-Typ ATPase und an ER-Fusionen beteiligt. Das *CDC48*-Gen ist essentiell und wurde deswegen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Temperatursensitive Mutanten könnten zum Nachweis einer Beteiligung von Cdc48p an PMN herangezogen werden. Als Cofaktor von Cdc48p gilt das p47-Homolog Shp1p (Ubx1p) [177], [162]. Shp1p rekrutiert ubiquitinierte Proteine zu degradativen aber auch zu nicht degradativen Funktionen von Cdc48p [177]. Eine Deletion von *SHP1* verhindert den Abbau von GFP-Osh1p und stellt einen ersten Hinweis auf die

Beteiligung der ER-Fusionsmaschinerie dar. Andere *UBX*-Gene sind nicht an PMN beteiligt (Abbildung 4.16).

Eine homotypische Fusion von Vakuolenmembranen benötigt Lipide wie Ergosterol, Diacylglycerol, PtdIns(3)P sowie PtdIns(4,5)P₂ [53]. Für PMN wird wie bereits erwähnt PtdIns(3)P benötigt. Das PtdIns(4,5)P₂ generierende Enzym Mss4p wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da das Protein essentiell ist.

Molekulargenetische Untersuchungen zeigen, dass Proteine, die an der homotypischen Vakuolenfusion beteiligt sind, auch für die Fusion von Autophagosomen und Cvt-Vesikeln mit der Vakuole notwendig sind. Dazu gehören die SNARE Proteine Vam3p, Vam7p, Vti1p und Ykt6p; die NSF und SNAP-Homologe Sec17p und Sec18p, die RabGTPase Ypt7p und Mitglieder des Klasse C / HOPS-Komplex [178], [179], [180, 181].

PMN benötigt die Q-SNAREs Vam3p und Vam7p. Ein möglicher Interaktionspartner wäre der Q_b-SNARE Vti1p. Untersuchungen mit temperatursensitiven Mutanten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit lieferten bisher kein eindeutiges Ergebnis. Als R-SNAREs während Fusionen der Vakuolenmembran kommen sowohl Nyv1p als auch Ykt6p in Frage. Welcher der beiden an PMN beteiligt ist, ist bisher unklar. *YKT6* ist essentiell und wurde nicht auf seine Funktion während PMN getestet, Nyv1p hingegen wird für PMN nicht benötigt. Kweon *et al.* beschreiben Ykt6p als notwendig für heterotypische Fusionen an der Vakuole, während Nyv1p eher an homotypischen Vakuolenfusionen beteiligt ist. Sie zeigten aber auch, dass Ykt6p als multifunktionaler R-SNARE durch Nyv1p während des Transportes der alkalischen Phosphatase ersetzt werden kann [182]. Diese Mechanismen sind auch für die Fusion der Vakuolenmembran während PMN denkbar.

Neben den SNAREs entscheiden membranspezifische Bindungsfaktoren über die Spezifikation einer Membranfusion. Im Falle der Vakuolenfusion sind dies die Proteine des HOPS-Komplexes. Vps33p ist ein Sec1p-ähnliches SNARE-bindendes Protein. Es wird während PMN benötigt. Ebenso ist Vps41p essentiell. Auch Vps39p und Ypt7p sind am Abbau von GFP-Osh1p beteiligt.

Für PMN wird Sec18p benötigt. Als Cofaktor des NSF wirkt das p115-Homolog Sec17, ein so genannter α -SNAP. Auch er wird für PMN gebraucht. Neben den bisher aufgeführten Faktoren benötigt die Vakuolenfusion auch LMA1, einen Komplex aus Thioredoxin und dem Proteaseinhibitor Pbi2p [45]. Vor der Fusion der Membranen ist Sec18p mit gebundenem ATP über Sec17p an den *cis*-SNARE Komplex gebunden. Die Hydrolyse von ATP führt zur Dissoziation des *cis*-SNARE Komplexes, zur Freisetzung von Sec17p und zur Übertragung von LMA1 auf den nun ungepaarten SNARE Vam3p. Vam3p wird in seiner offenen Konformation stabilisiert. Es binden die GTPase Ypt7p und die Komponenten des Klasse C / HOPS Komplexes. Vor der Fusion der Membranen muss LMA1 von Vam3p auf das vakuoläre Transporterchaperon Vtc3p übertragen werden. Bei Fusionsprozessen am Golgi-Apparat von Säugerzellen übernimmt GATE-16 die Funktion von LMA1. GATE-16 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein. Homologe von GATE-16 sind LC3 in Säugerzellen und Atg8p in Hefe [71]. Weiterhin wurden Wechselwirkungen von Atg8p mit den SNAREs Bet1p und Nyv1p gefunden [183]. Für den Abbau von GFP-Osh1p konnte keine Beteiligung von LMA1 gezeigt werden. Dies spricht für eine direkte Beteiligung der Autophagiemaschinerie, insbesondere von Atg8p-PE an den Membranfusionen während PMN.

Eine Beteiligung der V-ATPase an der Vakuolenfusion ist Gegenstand zahlreicher auch kontroverser Untersuchungen. So wird angenommen, dass die V_0 -Untereinheit an der Bildung von Poren zwischen gegenüberliegenden Membranen mitwirken [184]. Für den Abbau von GFP-Osh1p sind weder die membranständige V_0 -Untereinheit noch die cytosolische V_1 -Untereinheit notwendig.

Man nimmt an, dass Vtc1p und Vtc4p zusammen mit LMA1 den aktivierten Status der SNAREs stabilisieren [55]. Sie assoziieren direkt mit den SNAREs und der V_0 -Untereinheit der vakuolären ATPase [55, 185]. Das „Docking“ der Vakuolen ist abhängig von ihrer Ansäuerung und führt zu einer erhöhten Freisetzung von Calcium aus der Vakuole. Calcium aktiviert Calmodulin, das dann an V_0 bindet. Dies stimuliert die Ausbildung eines *trans*-Komplexes zwischen zwei Vakuolen [60].

Sowohl die Vtc-Proteine als auch die Untereinheiten der vakuolären ATPase werden nicht für PMN benötigt. Nur die Deletion von Vtc3p führt zum reduzierten Abbau von GFP-Osh1p. Möglicherweise kann die Funktion von Vtc3p durch andere Chaperone ersetzt werden.

Der VTC-Komplex hat neben der Beteiligung an Membranfusionen [186] weitere Funktionen. Uttenweiler *et al.* zeigen, dass der Komplex auch an der als Mikroautophagie bezeichneten Einstülpung der Vakuolenmembran beteiligt ist. Die Regulation soll dabei über eine Calcium-unabhängige Funktion von Calmodulin erfolgen [159, 176].

Die Bildung mikroautophagischer Vesikel erfolgt unabhängig von den zentralen Proteinen der homotypischen Vakuolenfusion [187]. Hier unterscheidet sich der untersuchte Abbau des PMN-Markerproteins GFP-Osh1p von der Mikroautophagie. Mikroautophagie wird von der Tor-Kinase und dem EGO-Signalkomplex kontrolliert [160]. Für den Abbau von GFP-Osh1p spielen diese Komponenten keine Rolle. Wie auch die Makroautophagie wird Mikroautophagie durch Nährstoffmangel oder Rapamycin induziert. Die Mikroautophagie soll dabei ein System darstellen, dass die durch Makroautophagie zur Vakuole gebrachten Membranbestandteile abbaut und so für eine Membranhomöostase an der Vakuole sorgt [187], [110]. Mikroautophagie würde damit indirekt von den ATG-Genen abhängen. Für den hier gezeigten Abbau von GFP-Osh1p werden die Atg-Proteine der Makroautophagie direkt benötigt. Die von Mayer *et al.* beschriebene Form der Mikroautophagie in *S. cerevisiae* dient vermutlich eher dem Abbau von Lipidkomponenten [110, 176].

Die Einstülpung der Vakuolenmembran während PMN zum Abbau von Teilen des ER ähnelt morphologisch dem mikroautophagischen Abbau von Peroxisomen in *Pichia pastoris*. Die Vakuolenmembran umschließt dabei einen Cluster aus Peroxisomen [115]. Das MIPA (micropexophagy specific membrane apparatus), eine transient auftretende Struktur, bildet sich vor der endgültigen Fusion der Vakuolenmembran um die Peroxisomen [114].

An der Bildung des MIPA in *P. pastoris* sind, wie auch an der Entstehung des PAS während der Autophagie in *S. cerevisiae*, viele der Atg-Proteine beteiligt [115], [151]. Da einige dieser Gene auch für PMN benötigt werden, kann in Betracht gezogen werden, dass während PMN eine PAS- bzw. MIPA-ähnliche Struktur agiert. Dafür spricht vor allem die Notwendigkeit von Atg8p für PMN. Kennzeichnend für das MIPA in *Pichia pastoris* sind *PpAtg8p* und *PpAtg26p*. In *S. cerevisiae* ist Atg26p jedoch nicht an der Autophagie beteiligt [161] und wird auch für PMN nicht benötigt. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen den beiden Hefen *P. pastoris* und *S. cerevisiae*.

Neben der Bildung des MIPA erfolgt auch eine Membranumbildung an der Vakuolenmembran selbst. Die für PMN benötigten Proteine wie der PtdIns-3-Komplex, Atg9p, Vac8p und in Abhängigkeit von Vac8p auch Atg11p [188], [189] können während der Mikropexophagie in *P. pastoris* an den entstehenden Vesikeln an der Vakuolenmembran lokalisiert werden. ATG24 codiert für das bereits erwähnte Sorting Nexin Atg24p. Atg24p reguliert in *P. pastoris* das Einschließen des Peroxisomen-Clusters durch die Vakuolenmembran, an die es über PtdIns(3)P bindet [190]. Eine Deletion von *ATG24* führt zu einer Reduktion des GFP-Osh1p-Abbaus (Abbildung 4.9). Daraus folgt eine mögliche Beteiligung von Atg24p an der Umbildung der Vakuolenmembran während PMN.

PMN benötigt einige Proteine der homotypischen Vakuolenfusion wie die SNAREs und den HOPS-Komplex. Über die Bildung der Membranhülle um die Peroxisomen im Verlauf der Mikropexophagie ist bisher wenig bekannt. Es wird in Erwägung gezogen, dass sich von der Vakuole Vesikel abschnüren, die den Peroxisomen-Cluster einhüllen und sich dann wie bei der homotypischen Vakuolenfusion vereinigen [190].

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in *P. pastoris* zeigten, dass Mutationen der GCN-Gene den Ablauf der Mikropexophagie inhibieren [191]. Eine detaillierte Funktion der Gcn-Proteine konnte jedoch bisher nicht beschrieben werden [114]. An PMN sind die Gcn-Proteine nicht beteiligt.

Wie neuere Untersuchungen zeigen, werden in *Saccharomyces cerevisiae* ER-Membranen in einem makroautophagocytotischen Prozess in Autophagosomen aufgenommen, zur Vakuole transportiert und dort abgebaut [192]. Es wird angenommen, dass dieser auch als „ER-Phagie“ bezeichnete Prozess dem Abbau von Teilen des ER und darin enthaltener, falsch gefalteter Proteine unter Autophagie-Bedingungen dient [193]. Bernales *et al.* zeigen, dass jedoch nur das kortikale ER über ER-Phagie abgebaut wird. Das ER um den Zellkern ist von diesem makroautophagischen Prozess ausgenommen [194].

Roberts *et al.* beschreiben PMN als Weg, um spezifisch Teile des Kern-ERs, des Zellkerns und möglicherweise von Teilen des Nucleolus proteolytisch in der Vakuole abzubauen [119].

Die hier gezeigten Daten zum Abbau von GFP-Osh1p sprechen dafür, dass es sich bei PMN um eine spezielle Form der Mikroautophagie in *S. cerevisiae* handelt. Es

werden die Proteine der Autophagie und des Cvt-Weges benötigt, insbesondere solche, die an der Bildung des PAS in *S. cerevisiae* und des MIPA in *P. pastoris* beteiligt sind. Es bleibt zu klären, wann die PAS-Struktur während PMN für die Membranfusion benötigt wird. Das PAS könnte für die Fusion der ER-Membranen benötigt werden, wahrscheinlicher ist jedoch eine Beteiligung an der Vakuolenfusion. Dabei könnte das PAS in Analogie zum MIPA den letzten Fusionsschritt zwischen den Membranen durchführen. Ob das PAS während PMN vergleichbar zum MIPA lokalisiert ist oder seitlich an den Membraneinstülpungen der Vakuole könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen klären.

Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob die Teile von ER und Zellkern durch PMN spezifisch abgebaut werden und dafür möglicherweise Sortiersignale wie eine Ubiquitinierung oder Sumoylierung notwendig sind. In zukünftige Untersuchungen sollte auch eine mögliche Beteiligung des Cytoskeletts näher analysiert werden.

5.2 Untersuchungen zur Lokalisierung, Aktivität und zum Transport von Atg15p

Neben den Untersuchungen zum Ablauf von PMN in *S. cerevisiae* war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, das an der Lyse autophagischer Vesikel beteiligte Protein Atg15p näher zu charakterisieren. Atg15p ist ein glykosiliertes, integrales Membranprotein, das über den MVB-Weg in die Vakuole gelangt. Atg15p besitzt am Aminoterminus eine kurze cytoplasmatische Domäne, gefolgt von einer Transmembrandomäne. Der Carboxyterminus und die aktive Domäne sind im Lumen des ER lokalisiert. In Zellen, in denen die vermeintliche Lipase fehlt, reichern sich Vesikel im Inneren der Vakuole an und proApe1p wird nicht gereift [107, 109].

Mit Hilfe von N- bzw. C-terminalen HA-Fusionen von Atg15p konnte dessen Lokalisierung mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz am ER und mittels Elektronenmikroskopie an MVB-Vesikeln gezeigt werden [109].

Die Erzeugung von entsprechenden GFP-Konstrukten während dieser Arbeit sollte eine direkte Lokalisierung von Atg15p mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen. Ausgehend von den HA-Konstrukten wurden GFP-Fusionskonstrukte erzeugt. Sowohl

die N- als auch die C-terminalen Fusionen von GFP führten zu Proteinen, die funktionell waren, wobei das cytosolisch orientierte GFP am N-Terminus von Atg15p eine größere biologische Aktivität besaß und ein stärkeres GFP-Signal ergab. Mit den erzeugten Konstrukten konnten jedoch nur bedingt die direkte Lokalisierung durchgeführt werden.

Die C-terminale Fusion von GFP an Atg15p konnte zwar wie erwartet am Kern-ER und bei Deletion von *PEP4* auch in der Vakuole detektiert werden, zeigte aber nur ein schwaches GFP-Signal. Die deglykosylierten Proteine zeigten im Vesikeltest weniger biologische Aktivität als die Konstrukte mit den drei Glykosilierungsstellen. Eine Reifung der proApe1p durch die Konstrukte konnte zwar gezeigt werden, war aber im Falle von Atg15-GFP und den deglykosylierten Proteinen nicht vollständig. Vermutlich reicht bereits eine kleine Menge von aktivem Atg15p, um proApe1p zu reifen.

Die N-terminale GFP-Fusion mit Atg15p zeigte zunächst eine völlig unerwartete Lokalisierung und entsprach nicht dem, was bisher aus der indirekten Immunfluoreszenz bekannt war. Es zeigten sich ringförmige Strukturen an der Plasmamembran, die in ihrer Struktur an die Sprossnarben von *S. cerevisiae* erinnerten (Abbildung 4.19). Sie entstehen bei der Zellteilung der Hefezellen und lassen sich mit Lectin-gekoppelten Markerproteinen nachweisen.

In einem Genom-weiten DNA-Array wurde gezeigt, dass die Expression von Atg15p ansteigt, wenn *CBK1* deletiert ist [163]. Cbk1p ist an der Regulation der Zellteilung und an der Festlegung des Knospungsmusters in *S. cerevisiae* beteiligt. Die Deletion von *CBK1* beeinflusst dabei vor allen die Expression von Proteinen, die an Modifizierungen der Zellwand beteiligt sind. Dazu gehört z.B. auch die Chitin-Synthase Chs1p [163]. Eine eindeutige Colokalisierung von GFP-Atg15p mit den Sprossnarben mittels Fluoreszenz-Mikroskopie war nicht möglich, auch nicht bei Verwendung eines Laser-Scanning Mikroskops. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung mittels Immunogold-Markierung des Proteins zeigte schließlich, dass die Expression von GFP-Atg15p zu einer Proliferation des ER führte. Die Expression von Atg15p mit einer N-terminalen GFP-Fusion unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors stören offenbar den Transport des Proteins durch das sekretorische System. Falsch gefaltete Proteine werden im frühen sekretorischen Weg zurückgehalten [195]. Für die direkte Lokalisierung von Atg15p scheinen die Vektorsysteme pUG35 und pUG36 nicht geeignet, da hier Proteine unter der

Kontrolle des *MET25*-Promotors stark überexprimiert werden. Für weiterführende Experimente wäre es daher günstiger, die GFP-Fusionen unter der Kontrolle des endogenen *ATG15*-Promotors zu exprimieren.

Zusammen mit den Lokalisierungsstudien der GFP-Atg15p-Konstrukte erfolgte auch eine Klonierung von C-terminal trunkierten GFP-Atg15p-Konstrukten. Atg15p wurde als putative Serin-aktive Lipase beschrieben. Es enthält das dafür typische Motiv G-X-S-X-G innerhalb der Aminosäuren 325-335 [107, 109]. Lipasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin. Die Asparaginsäure entzieht dem Histidin ein Proton und aktiviert es auf diese Weise. Das katalytische aktive Histidin zieht vom Serin wiederum ein Proton ab, wodurch die Nucleophilie des Serinrestes ansteigt. Dieser kann nun an dem Carbonylkohlenstoff eines Substratesters angreifen, der bereits im aktiven Zentrum lokalisiert ist. Es bildet sich ein tetraedrisches Zwischenprodukt aus dem ein Acylenzymkomplex entsteht. In einem Hydrolyseschritt werden durch Deacetylierung das Produkt und das ursprüngliche Enzym frei [196]. Atg15p enthält an den Positionen 387 und 421 je eine konservierte Asparaginsäure und in Position 435 ein konserviertes Histidin, die an der katalytischen Triade beteiligt sein könnten [107].

In dem Konstrukt GFP-Atg15p $_{\Delta 400-520}$ fehlen das Histidin an Position 435 sowie die Asparaginsäure an den Positionen 421 und eine weitere konservierte Asparaginsäure in Position 462. Das um 120 Aminosäuren trunkierte Fusionsprotein ist biologisch inaktiv. Ebenso das Konstrukt GFP-Atg15p $_{\Delta 440-520}$, in dem nur die Asparaginsäure an Position 462 fehlt. Fehlt nur der C-Terminus ab der Aminosäure 480, ist das Konstrukt aktiv. Damit konnte gezeigt werden, dass sich in dem Abschnitt von Aminosäure 400 bis 480 das für die katalytische Triade benötigte Histidin und die Asparaginsäure befinden. In weiterführenden Experimenten könnten die gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren detaillierte Aussagen über ihre Notwendigkeit für die Aktivität von Atg15p ermöglichen.

Da auch die trunkierten GFP-Atg15p Konstrukte zu einer ER-Proliferation führten, konnten weder der Transport noch die Lokalisierung der Konstrukte mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie identifiziert werden.

Atg15p ist in der Vakuole an der Lyse von autophagischen Vesikeln beteiligt, ohne dabei jedoch die Vakuolenmembran selbst zu lysieren. Für den Mechanismus dieser

spezifischen Membranlyse durch Atg15p werden verschiedene Modelle diskutiert [107, 109], [197]. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, wann Atg15p aktiv ist und ob das Enzym eventuell eine hohe Substratspezifität besitzt. In dieser Arbeit wurden neben den gezeigten Untersuchungen zu Atg15p auch verschiedene mögliche Substrate getestet. Es konnte jedoch kein spezifisches Atg15p-Substrat identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Mit den getesteten ALP-Atg15-Konstrukten sollte der Einfluss der Atg15p-Aktivität auf verschiedene am Transport beteiligte Kompartimente untersucht werden. Das durch homologe Rekombination erhaltene ALP-Atg15p-Konstrukt ohne das aktive Serin verliert im Vergleich zum Ausgangsprodukt seine biologische Aktivität. Dies konnte im Vesikelttest sowie durch Anreicherung von proApe1p gezeigt werden. Für weitere Untersuchungen standen somit ein aktives sowie ein inaktives Atg15p-Konstrukt zur Verfügung.

Wird Atg15p über den MVB-Weg zur Vakuole transportiert, gelangt es an den inneren MVB-Vesikeln in das Lumen der Vakuole. Durch die Fusion mit dem cytosolischen Teil der Alkalischen Phosphatase werden Fusionsproteine über den ALP-Weg vorbei am späten Endosom zur Vakuole transportiert [18]. Nach Fusion der ALP-Vesikel mit der Vakuolenmembran gelangt ALP-Atg15p somit direkt in die vakuoläre Membran.

Zunächst wurden das aktive bzw. das inaktive ALP-Atg15p-Konstrukt in verschiedenen Autophagie-Mutanten unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors überexprimiert. Zellen des Lyse-defizienten Stammes *atg15Δ pep4Δ* wachsen nach der Überexpression des aktiven ALP-Atg15-Konstruktes schlechter als Zellen, in denen inaktives Atg15p exprimiert wird. Der Effekt verstärkte sich durch Inkubation bei 37°C. Anhand dieser Wachstumsphänotypen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Proteinase A (Pep4p) nicht für die Aktivität von Atg15p benötigt wird. Pep4p ist an der Lyse von MVB-Vesikeln beteiligt, in *pep4Δ*-Zellen werden MVB-Vesikel stabilisiert [109]. Möglicherweise erfolgt eine Regulation der Atg15p-Aktivität durch einen Abbau von Atg15p durch Proteinase A.

Die Überexpression von inaktivem ALP-Atg15p bei 37°C zeigte einen weiteren Effekt. Ist nur *ATG15*, nicht jedoch Proteinase A deletiert, wachsen die Zellen mit dem inaktiven Protein schlechter als die Zellen mit den aktiven Atg15p-Konstrukten. Bei der höheren Temperatur kommt es verstärkt zur Bildung von falsch gefalteten

Proteinen. Hinzu kommt die massive Überexpression eines inaktiven Proteins, das ebenfalls in den Zellen abgebaut werden soll. Fehlt Atg15p als lytisches Enzym, ist dieser Abbau verlangsamt und die Zellen wachsen schlechter. Durch die Überexpression von Atg15p mit einem 2µ Plasmid konnte dies bestätigt werden; diese Zellen mit einer verstärkten Expression von aktivem Atg15p zeigen den Wachstumsphänotyp bei 37°C nicht.

Weiterhin sollte untersucht werden, an welchen Punkten des Transportes vom Golgi zur Vakuole die lytische Aktivität von Atg15p einen Wachstumsdefekt auslöst. Dazu wurden Deletionsstämme von *APM3* und *VPS11* untersucht.

Apm3p bildet die zentrale AP-µ-Untereinheit im AP-3-Komplex. Fehlt *APM3*, sollte der Transport der ALP-Atg15p-Konstrukte zur Vakuole gestört und der Wachstumsphänotyp aufgehoben sein. Diese Annahme konnte in den untersuchten *apm3Δ*-Deletionsstämmen bestätigt werden. In den *APM3*-defizienten Zellen gelangte das Fusionsprotein nicht mehr an die Vakuolenmembran, es trat kein Wachstumseffekt mehr auf.

Vps11p ist ein Bestandteil des HOPS-Komplexes. Fehlt *VPS11*, erfolgen keine Fusionen der ALP-Vesikel mit der Vakuolenmembran. Die untersuchten *vps11Δ*-Zellen wuchsen sehr schlecht. Nach der Überexpression der ALP-Atg15p-Konstrukte und vor allem bei zusätzlichem Temperaturstress zeigten sich negative Wachstumseffekte. Atg15p, das in großer Menge in den ALP-Vesikeln vorliegt, schädigt die Vesikel und offenbar auch die Zellen. Diese Effekte traten schon ohne Induktion des *GAL1*-Promotors auf, was auf eine leichte Induktion des Promotors durch Glukose zurück zu führen sein könnte. Dies sollte in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden. Dabei wäre es auch denkbar, die Wirkung der ALP-Atg15p-Konstrukte in Deletionsstämmen von *YPT7* zu untersuchen. Weiterhin könnten die untersuchten ALP-Atg15p-Konstrukte mit einem Retentionssignal (HDEL) für das ER versehen werden, um eine mögliche Aktivität des Fusionsproteins bereits im ER untersuchen zu können.

Die ALP-Atg15p-Fusionsproteine wurden auch in *atg1Δ*- und *atg3Δ*-Stämmen überexprimiert, in denen die Induktion der Autophagie gestört ist. In Zellen trat ein deutlicher negativer Wachstumseffekt auf. Eine Verstärkung des Effekts konnte durch zusätzlichen Temperaturstress erreicht werden. Somit konnte gezeigt werden,

dass die Autophagiemaschinerie notwendig ist, wenn es durch Überexpression und zusätzlichen Temperaturstress zur Anreicherung von Proteinen kommt, die von der Zelle nicht direkt benötigt werden. Dieser Effekt sollte auch bei der Überexpression anderer stark überexprimierter Proteine eintreten.

Für den Eintritt der Proteine in den MVB-Weg sind verschiedene Mechanismen bekannt. Procarboxypeptidase S (proCps1) wird Ubiquitin-abhängig über den MVB-Weg transportiert. Sna3p ist ein Protein mit zwei Transmembrandomänen, C- und N-Terminus sind im Cytosol lokalisiert. Es wird ebenfalls über den MVB-Weg in Abhängigkeit von der ESCRT-Maschinerie zur Vakuole transportiert [12]. Zunächst wurde ein Ubiquitin-unabhängiger Transport von Sna3p in *doa4Δ*-Zellen beschrieben [12]. Mittels zweier unterschiedlicher Proteomanalysen wurde dann aber im Sna3p das Lysin an Position 125 als ein Substrat für Polyubiquitinierung identifiziert [167], [166]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in *doa4Δ pep4Δ*-Stämmen das Ubiquitinierungsmuster sowohl für GFP-Sna3p als auch für GFP-Sna3p^{K125R} stabilisiert werden. Der Austausch des Lysins gegen Arginin durch zielgerichtete Mutagenese veränderte das Ubiquitinierungsmuster, was durch an den Größenunterschieden der mit GFP-Antikörper detektierten Banden sichtbar wurde (Abbildung 4.28). Die durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisierung der beiden Konstrukte zeigten keine Unterschiede. GFP-Sna3p und auch GFP-Sna3p^{K125R} wurden unabhängig von *DOA4* in die Vakuole transportiert. Wie auch von Oestreich *et al.* beschrieben, ist eine Ubiquitinierung von Sna3p nicht notwendig, unterstützt aber dessen Transport im MVB-Weg [17]. Neuere Studien konnten zeigen, dass die HECT-Ubiquitin-Ligase Rsp5, die mit einem PPAY-Motiv im Sna3p interagiert, für dessen Transport im MVB-Weg nötig ist [16], [17]. Rsp5p interagiert direkt mit Sna3p, eine Ubiquitinierung ist nicht notwendig, aber verbessert den Transport von Sna3p im MVB-Weg.

Die Analyse des Ubiquitinierungsstatus des Atg15p ergab, anders als für Sna3p gezeigt, kein typisches Ubiquitinierungsmuster (Abbildung 4.29). Lediglich eine Glykosilierung von Atg15p konnte nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Epple *et al.* [107], die zeigen, dass Atg15p ein glykosiliertes Transmembranprotein ist. Weiterhin wurde mit indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt, dass die Sortierung von Atg15 im Gegensatz zu Cps1p nicht von einer Ubiquitinierung abhängt. Cps1p benötigt die Ubiquitinierung durch Tul1p

und wird in *doa4Δ*-Zellen nicht in die Vakuole transportiert. Der Transport von Atg15p ist unabhängig von Tul1p und Doa4p [109]. ProCps1p enthält im N-terminalen, cytosolischen Bereich Bindestellen für Ubiquitin. Das hier untersuchte Atg15 $_{\Delta 2-12}$ -3xHA-Konstrukt zeigt, dass die cytosolische Domäne von Atg15p keinen Einfluss auf seine Ubiquitinierung hat.

PPxY- und PxY-Motive sind Bindungsstellen für Rsp5p, dessen WW-Domänen mit den Motiven interagieren [198]. Atg15p besitzt wie Sna3p ein PxY-Motiv in der Nähe der Transmembrandomäne und somit im luminalen Bereich. Es sollte daher untersucht werden, ob das Motiv im Atg15p für die Sortierung über den MVB-Weg nötig ist. Dafür wurde in verschiedenen Atg15p-Konstrukten das Tyrosin in Position 38 gegen ein Alanin ausgetauscht. Die erzeugten Konstrukte Atg15p^{Y38A}-HA und ALP₁₋₅₈Atg15p^{Y38A}-HA waren biologisch aktiv, wie der Vesikelttest und die Ape1p-Reifung zeigten. Allerdings konnte eine Misslokalisierung der Fusionskonstrukte nicht ausgeschlossen werden, da ja bereits kleine Mengen von Atg15p, die in der Vakuole ankommen, ausreichen, um autophagische Vesikel zu lysieren. Aus diesem Grund wurden die Atg15p-Konstrukte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie in den Zellen lokalisiert. Das ALP₁₋₅₈Atg15p-HA-Konstrukt konnte wie erwartet in der Vakuole nachgewiesen werden. Die mutagenisierte Form des Fusionskonstruktes ohne PxY-Motiv zeigte die gleiche Lokalisierung. Der Transport beider Konstrukte ist in diesem Falle abhängig von der Signalsequenz in der aminoterminalen Domäne der alkalischen Phosphatase. Der Transport dieser Konstrukte erfolgte direkt zur Vakuole und nicht über das späte Endosom [22]. Das Wildtyp-Protein Atg15-HA konnte am Kern-ER und in *pep4Δ*-Zellen zusätzlich an 50 nm großen Vesikeln in der Vakuole lokalisiert werden [107]. Erste Untersuchungen mit Atg15p^{Y38A}-HA zeigten nicht diese Verteilung in der Zelle, sondern eine eher diffusere Verteilung des Proteins. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um eine endgültige Aussage über den Einfluss des PxY-Motivs auf die Sortierung von Atg15p treffen zu können. Mittels eines überexprimierenden Konstruktes, z.B. durch die Verwendung eines 2 μ Plasmids, könnte einen möglichen Effekt noch deutlicher werden. Im Sna3p befindet sich das Motiv im cytosolischen Teil und wird dort von Rsp5p erkannt [17], [16]. Wenn das Sorting von Atg15p vom PxY-Motiv abhängt, liegt diese Zielsequenz im luminalen Bereich des Proteins. Allerdings liegt die Sequenz in der Nähe der Transmembrandomäne, so dass eine Erkennung durch Rsp5p noch möglich wäre. Auch für das Proteins Pmel17p wurde der Transport im

MVB-Weg in Abhängigkeit von zwei luminalen Proteindomänen und unabhängig vom cytosolischen Teil beschrieben [199]. *RSP5* ist essentiell, es wird aber eine inaktive Punktmutante beschrieben [200]. Eine zusätzliche Deletion von *PEP4* in dieser Punktmutante könnte weitere Aufschlüsse über die Wechselwirkungen von Rsp5p mit dem PxY-Motiv von Atg15p liefern. Denkbar wären auch Untersuchungen über Wechselwirkungen von Atg15p und dem kürzlich beschriebenen Mvb12p [201], [202], dass zusammen mit dem ESCRT-I-Komplex am Ubiquitin-unabhängigen Transport von Sna3p beteiligt ist.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Farre, J.C. and S. Subramani, *Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(9): p. 515-523.
2. Goffeau, A.B., Borell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hohesiel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S. G, *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**: p. 546.
3. Guthrie, C. and G.R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Methods in Enzymology, 1991. **194**.
4. Lodish, H., et al., *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2001. **4. Auflage**.
5. Klionsky, D.J., L.M. Banta, and S.D. Emr, *Intracellular sorting and processing of a yeast vacuolar hydrolase: proteinase A propeptide contains vacuolar targeting information*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(2105-2511).
6. Ammerer, G., et al., *PEP4 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors*. Mol Cell Biol, 1986. **6**: p. 2490-2499.
7. Babst, M., *A protein's final ESCRT*. Traffic, 2005. **6**(1): p. 2-9.
8. Bowers, K. and T.H. Stevens, *Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1744**(3): p. 438-454.
9. Hurley, J.H. and S.D. Emr, *The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 277-298.
10. Pornillos, O., J.E. Garrus, and W.I. Sundquist, *Mechanisms of enveloped RNA virus budding*. Trends Cell Biol, 2002. **12**: p. 569-579.
11. Boes, M., A. Cuvilier, and H. Ploegh, *Membrane specializations and endosome maturation in dendritic cells and B cells*. Trends Cell Biol, 2004. **14**: p. 175-183.
12. Reggiori, F. and H.R. Pelham, *Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting*. Embo J, 2001. **20**(18): p. 5176-5186.
13. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I*. Cell, 2001. **106**(2): p. 145-155.
14. Hicke, L., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**: p. 195-201.
15. Hettema, E.H., V.-T. J., and H.R. Pelham, *Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins*. Embo J, 2004. **6**: p. 1279-1288.
16. McNatt, M.W., et al., *Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 697-706.
17. Oestreich, A.J., et al., *Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 707-720.

18. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *A new Class of Lysosomal/Vacuolar Protein Sorting Signals*. JBC, 1990. **265**: p. 5349-5352.
19. Cowles, C.R., et al., *Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component*. Embo J, 1997. **16**(10): p. 2769-2782.
20. Robinson, M.S., *The role of clathrin, adaptors, and dynamin in endocytosis*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**: p. 538-544.
21. Yeung, B.G., H.L. Phan, and G.S. Payne, *Adaptor complex-independent clathrin function in yeast*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3643-3659.
22. Odorizzi, G., C.R. Cowles, and S.D. Emr, *The AP-3 complex: a coat of many colours*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(7): p. 282-288.
23. Cowles, C.R., et al., *The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole*. Cell, 1997. **91**(1): p. 109-118.
24. Glick, B.S. and J.H. Rothman, *Possible role for fatty acylcoenzyme A in intracellular protein transport*. Nature, 1987. **326**: p. 3753-3766.
25. Wilson, D.W., et al., *A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast*. Nature, 1989. **339**: p. 355-359.
26. Clary, D.O., I.C. Griff, and J.H. Rothman, *SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast*. Cell, 1990. **61**: p. 709-721.
27. Griff, I.C., et al., *The yeast SEC17 gene product is functionally equivalent to mammalian alpha-SNAP protein*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 12106-12115.
28. Söllner, T., et al., *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature, 1993. **362**: p. 318-324.
29. Bock, J.B., et al., *A genomic perspective on membrane compartment organization*. Nature, 2001. **409**: p. 893-841.
30. Rothman, J.H., *Mechanisms of intracellular protein transport*. Nature, 1994. **372**: p. 55-63.
31. Fasshauer, D., et al., *Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**: p. 15781-15786.
32. Jahn, R. and R.H. Scheller, *SNAREs--engines for membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 631-643.
33. Rizo, J. and T.C. Südhof, *Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion*. Nat. Rev. Neurosci., 2002. **3**: p. 641-653.
34. Halachmi, N. and Z. Lev, *The sec1-family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion*. J Neurochem, 1996. **66**(889-897).
35. Wickner, W. and A. Haas, *Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 247-275.
36. Haas, A., *A quantitative assay to measure homotypic vacuole fusion in vitro*. Methods Cell Sci, 1995. **17**: p. 283-294.
37. Mayer, A., W. Wickner, and A. Haas, *Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (a-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles*. Cell, 1996. **85**: p. 83-94.
38. Ungermann, C., et al., *Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion*. J Cell Biol, 1999. **145**: p. 1435-1442.
39. Dietrich, L.E., et al., *ATP-independent control of Vac8 palmitoylation by a SNARE subcomplex on yeast vacuoles*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15348-15355.

40. Fukuda, R., et al., *Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE*. Nature, 2000. **407**: p. 198-202.
41. Dilcher, M., B. Kohler, and G.F. von Mollard, *Genetic interactions with the yeast Q-SNARE VTI1 reveal novel functions for the R-SNARE YKT6*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34537-34544.
42. Dietrich, L.E., et al., *The SNARE Ykt6 is released from yeast vacuoles during an early stage of fusion*. EMBO Rep, 2005. **6**(3): p. 245-250.
43. Stroupe, C., et al., *Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p*. Embo J, 2006. **25**(8): p. 1579-1589.
44. Ungermann, C. and W. Wickner, *Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion*. Embo J, 1998. **17**(12): p. 3269-3276.
45. Xu, Z., et al., *A heterodimer of thioredoxin and I(B)2 cooperates with Sec18p (NSF) to promote yeast vacuole inheritance*. J Cell Biol, 1997. **136**: p. 299-306.
46. Whyte, J.R. and S. Munro, *Vesicle tethering complexes in membrane traffic*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 13): p. 2627-2637.
47. Seals, D.F., et al., *A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9402-9407.
48. Wurmser, A.E., T.K. Sato, and S.D. Emr, *New component of the vacuolar class C Vps complex nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking/fusion*. J Cell Biol, 2000. **151**: p. 551-562.
49. Peplowska, K., et al., *The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis*. Dev Cell, 2007. **12**: p. 739-745.
50. Mayer, A., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 807-817.
51. Kato, M. and W. Wickner, *Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion*. Embo J, 2001. **20**: p. 4035-4040.
52. Wang, L., et al., *Hierarchy of protein assembly at the vertex ring domain for yeast vacuole docking and fusion*. J Cell Biol, 2003. **273**: p. 29565-29576.
53. Fratti, R.A., et al., *Interdependent assembly of specific regulatory lipids and membrane fusion proteins into the vertex ring domain of docked vacuoles*. J Cell Biol, 2004. **167**: p. 1087-1098.
54. Ungermann, C. and D. Langosch, *Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 17): p. 3819-3828.
55. Muller, O., et al., *The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation*. Embo J, 2002. **21**(3): p. 259-269.
56. Wang, C.W., et al., *Vacuole fusion at a ring of vertex docking sites leaves membrane fragments within the organelle*. Cell, 2002. **108**: p. 357-369.
57. Subramanian, K., et al., *Palmitoylation determines the function of Vac8 at the yeast vacuole*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 12): p. 2477-2485.
58. Peters, C. and A. Mayer, *Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion*. Nature, 1998. **396**: p. 575-580.
59. Eitzen, G., *Actin remodeling to facilitate membrane fusion*. Biochem Biophys Acta, 2003. **1641**: p. 175-181.
60. Peters, C., et al., *Trans-complex formation of proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion*. Nature, 2001. **409**: p. 581-588.

61. Bayer, M.J., et al., *Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel*. J Cell Biol, 2003. **162**: p. 211-222.
62. Wickner, W., *Yeast vacuoles and membrane fusion pathways*. Embo J, 2002. **21**(6): p. 1241-1247.
63. Elazar, Z., R. Scherz-Shouval, and H. Shorer, *Involvement of LMA1 and GATE-16 family members in intracellular membrane dynamics*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1641**(2-3): p. 145-156.
64. Klionsky, D.J., R. Cueva, and D.S. Yaver, *Aminopeptidase I of Saccharomyces cerevisiae is localized to the vacuole independent of the secretory pathway*. J Cell Biol, 1992. **119**: p. 287-299.
65. Oda, M.N., et al., *Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I*. J Cell Biol, 1996. **132**: p. 999-1010.
66. Kim, J., et al., *Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway*. J Cell Biol, 1997. **137**(3): p. 609-618.
67. Scott, S.V., et al., *Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12304-12308.
68. Baba, M., et al., *Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome*. J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1687-1695.
69. Hutchins, M.U. and D.J. Klionsky, *Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20491-20498.
70. Harding, T.M., et al., *Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17621-17624.
71. Klionsky, D.J., et al., *A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes*. Dev Cell, 2003. **5**(4): p. 539-545.
72. Huang, J. and D.J. Klionsky, *Autophagy and human disease*. Cell Cycle, 2007. **6**: p. 1837-1849.
73. Tuttle, D.L. and W.A. Dunn, *Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. J Cell Sci, 1995. **108**: p. 25-35.
74. Bursch, W., et al., *Autophagocytosis and programmed cell death*. Autophagy, 2004: p. 287-303.
75. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-477.
76. Melendez, A., et al., *Autophagy genes are essential for dauer development and life span extension in C. elegans*. Science, 2003. **301**: p. 1387-1391.
77. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. **306**(5698): p. 990-995.
78. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. Oncogene, 2004. **23**: p. 2891-2906.
79. Qu, X., et al., *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene*. J Clin Invest., 2003. **112**: p. 1809-1820.
80. Ueno, T., I. Tanida, and E. Kominami, *Autophagy and neuromuscular disease*. Autophagy, 2004: p. 264-286.
81. Yuan, J., M. Lipinski, and A. Degtarev, *Diversity in the mechanisms of neuronal cell death*. Neuron, 2003. **40**: p. 401-413.

82. Klionsky, D.J., *Cell biology: regulated self-cannibalism*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 31-32.
83. Reggiori, F. and D.J. Klionsky, *Autophagy in the eukaryotic cell*. Eukaryot Cell, 2002. **1**(1): p. 11-21.
84. Massey, A., R. Kiffin, and A.M. Cuervo, *Pathophysiology of chaperon-mediated autophagy*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2004. **36**: p. 2420-2434.
85. Klionsky, D.J., *The molecular machinery of autophagy: unanswered questions*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 7-18.
86. Abeliovich, H., *Regulation of autophagy by the target of rapamycin (Tor) proteins*. Autophagy, 2004: p. 60-69.
87. Kamada, Y., et al., *Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1507-1513.
88. Kabeya, Y., et al., *Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(5): p. 2544-2553.
89. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 1593-1605.
90. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 29889-29894.
91. Proikas-Cezanne, T., et al., *WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy*. Oncogene, 2004. **23**(58): p. 9314-9325.
92. Juhasz, G. and T. Neufeld, *Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source*. PLoS Biol, 2006. **4**(2): p. 161-164.
93. Kihara, A., et al., *Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2001. **152**: p. 519-530.
94. Ichimura, Y., et al., *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation*. Nature, 2000. **408**: p. 488-492.
95. Kim, J., et al., *Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(5): p. 1337-1351.
96. Tanida, I., et al., *Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(5): p. 1367-1379.
97. Kirisako, T., et al., *Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7 in yeast*. J Cell Biol, 1999. **147**(435-446).
98. Abeliovich, H., et al., *Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps*. J Cell Biol, 2000. **151**(5): p. 1025-1034.
99. Kuma, A., et al., *Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg15-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 18619-18625.
100. Chang, T., et al., *PpATG9 encodes a novel membrane protein that traffics to vacuolar membranes, which sequester peroxisomes during pexophagy in Pichia pastoris*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4941-4953.
101. He, C. and D.J. Klionsky, *Atg9 trafficking in autophagy-related pathways*. Autophagy, 2007. **3**(3): p. 271-274.
102. Reggiori, F., et al., *The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure*. Dev Cell, 2004. **6**(1): p. 79-90.

103. Nakamura, N., et al., *Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem, 1997. **121**: p. 338-344.
104. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Permeases recycle amino acids resulting from autophagy*. Autophagy, 2007. **3**(2): p. 149-150.
105. Yang, Z., et al., *Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(12): p. 5094-5104.
106. Suriapranata, I., et al., *The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 22)**: p. 4025-4033.
107. Epple, U.D., et al., *Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole*. J Bacteriol, 2001. **183**(20): p. 5942-5955.
108. Thumm, M., et al., *Isolation of autophagocytosis mutants of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1994. **349**(2): p. 275-280.
109. Epple, U.D., E.L. Eskelinen, and M. Thumm, *Intravacuolar membrane lysis in Saccharomyces cerevisiae. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function?* J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7810-7821.
110. Muller, O., et al., *Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 519-528.
111. Klionsky, D.J. and Y. Ohsumi, *Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 1-32.
112. Sakai, Y. and S. Subramani, *Environmental response of yeast peroxisomes: aspects of organelle assembly and degradation*. Cell Biochem Biophys, 2000. **32**: p. 51-61.
113. Kim, J. and D.J. Klionsky, *Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 303-342.
114. Sakai, Y., et al., *Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(12): p. 1767-1775.
115. Mukaiyama, H., et al., *Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(1): p. 58-70.
116. Dunn, W.A., Jr., et al., *Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes*. Autophagy, 2005. **1**(2): p. 75-83.
117. Hutchins, M.U., M. Veenhuis, and D.J. Klionsky, *Peroxisome degradation in Saccharomyces cerevisiae is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 22)**: p. 4079-4087.
118. Pan, X. and D.S. Goldfarb, *YEB3/VAC8 encodes a myristylated armadillo protein of the Saccharomyces cerevisiae vacuolar membrane that functions in vacuole fusion and inheritance*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 15)**: p. 2137-2147.
119. Roberts, P., et al., *Piecemeal microautophagy of nucleus in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(1): p. 129-141.
120. Moskvina, E., et al., *A search in the genome of Saccharomyces cerevisiae for genes regulated via stress response elements*. Yeast, 1998. **14**: p. 1041-1050.
121. Kvam, E. and D.S. Goldfarb, *Structure and function of nucleus-vacuole junctions: outer-nuclear-membrane targeting of Nvj1p and a role in tryptophan uptake*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 17): p. 3622-3633.
122. Mizushima, N., et al., *A protein conjugation system essential for autophagy*. Nature, 1998. **395**(6700): p. 395-398.

123. Pan, X., et al., *Nucleus-vacuole junctions in Saccharomyces cerevisiae are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(7): p. 2445-2457.
124. Wang, Y.X., et al., *Fusion of docked membranes requires the armadillo repeat protein Vac8p*. J Biol Chem, 2001. **140**: p. 1063-1074.
125. Scott, S.V., et al., *Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25840-25849.
126. Kohlwein, S.D., et al., *Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(1): p. 109-125.
127. Schneiter, R. and S.D. Kohlwein, *Organelle structure, function, and inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis*. Cell, 1997. **88**: p. 431-434.
128. Kvam, E., et al., *Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: a role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 3987-3998.
129. Levine, T., *Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions*. Trends Cell Biol, 2004. **14**: p. 483-490.
130. Levine, T.P. and S. Munro, *Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1633-1644.
131. Kvam, E. and D.S. Goldfarb, *Nucleus-vacuole junctions in yeast: anatomy of a membrane contact site*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 340-342.
132. Hochstrasser, M., et al., *The Saccharomyces cerevisiae ubiquitin-proteasome system*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1389): p. 1513-1522.
133. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol., 1983. **166**: p. 557-580.
134. Suzuki, K., et al., *The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation*. Embo J, 2001. **20**(21): p. 5971-5981.
135. Güldener, U., et al., *A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**: p. 2519-2524.
136. Sikorski, R.S. and P. Hieter, *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**(1): p. 19-27.
137. Krick, R., et al., *The relevance of the phosphatidylinositolphosphat-binding motif FRRGT of Atg18 and Atg21 for the Cvt pathway and autophagy*. FEBS Lett, 2006. **580**(19): p. 4632-4638.
138. Loewen, C.J., A. Roy, and T.P. Levine, *A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP*. Embo J, 2003. **22**(9): p. 2025-2035.
139. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
140. Sacher, M., et al., *TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport*. Mol Cell, 2001. **7**: p. 433-442.
141. Orth, T., et al., *The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in Arabidopsis*. Plant Cell, 2007.
142. Kvam, E. and D.S. Goldfarb, *Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 21): p. 4959-4968.

143. Kvam, E. and D.S. Goldfarb, *Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in S. cerevisiae*. *Autophagy*, 2007. **3**(2): p. 85-92.
144. Cheong, H., et al., *Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(7): p. 3438-3453.
145. Kabeya, Y., et al., *Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **356**(2): p. 405-410.
146. Yen, W.L. and D.J. Klionsky, *Atg27 is a second transmembrane cycling protein*. *Autophagy*, 2007. **3**(3): p. 254-256.
147. Wang, C.W., et al., *Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(32): p. 30442-30451.
148. Kawamata, T., et al., *Characterization of a novel autophagy-specific gene, ATG29*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(4): p. 1884-1889.
149. Di Paolo, G. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. *Nature*, 2006. **443**: p. 651-657.
150. Dove, S.K., et al., *Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors*. *Embo J*, 2004. **23**(9): p. 1922-1933.
151. Nice, D.C., et al., *Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 30198-30207.
152. Seaman, M.N., *Recycle your receptors with retromer*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(2): p. 68-75.
153. Hettema, E.H., et al., *Retromer and sorting nexines Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways for yeast endosomes*. *Embo J*, 2003. **22**: p. 548-557.
154. Meiling-Wesse, K., et al., *Trs85 (Gsg1), a component of the TRAPP complexes, is required for the organization of the preautophagosomal structure during selective autophagy via the Cvt pathway*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(39): p. 33669-33678.
155. Conibear, E., J.N. Cleck, and T.H. Stevens, *Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(4): p. 1610-1623.
156. Abeliovich, H., T. Darsow, and S.D. Emr, *Cytoplasm to vacuole trafficking of aminopeptidase I requires a t-SNARE-Sec1p complex composed of Tlg2p and Vps45p*. *Embo J*, 1999. **18**(21): p. 6005-6016.
157. Bonifacino, J.S. and B.S. Glick, *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 153-166.
158. Manolson, M.F., et al., *STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(19): p. 14064-14074.
159. Uttenweiler, A., et al., *The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(1): p. 166-175.
160. Dubouloz, F., et al., *The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast*. *Mol Cell*, 2005. **19**(1): p. 15-26.
161. Cao, Y. and D.J. Klionsky, *Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 2007. **3**(1): p. 17-20.
162. Meyer, H.H., *Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1744**(3): p. 481-492.

163. Bidlingsmaier, S., et al., *The Cbk1p Pathway is important for polarized cell growth and cell separation in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2449-2462.
164. Taxis, C., *Proteinqualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum: Variationen im Abbaumechanismus von löslicher und membrangebundener missgefalteter Carboxypeptidase Y (CPY*)*. 2002.
165. Babst, M., *A close-up of the ESCRTs*. Dev Cell, 2006. **10**(5): p. 547-548.
166. Peng, J., et al., *A proteomics approach to understanding protein ubiquitination*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(8): p. 921-926.
167. Hitchcock, A.L., et al., *A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12735-12740.
168. Seglen, P.O. and P. Bohley, *Autophagy and other protein degradation mechanisms*. Experientia, 1992. **48**(158-172).
169. Noda, T., et al., *Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways*. J Cell Biol, 2000. **148**(3): p. 465-480.
170. Obara, K., T. Sekito, and Y. Ohsumi, *Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes--Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 1527-1539.
171. Tucker, K.A., et al., *Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48445-48452.
172. Yen, W.L., et al., *Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 581-593.
173. Wurmser, A.E. and S.D. Emr, *Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy*. J Cell Biol, 2002. **158**: p. 761-772.
174. Nazarko, T.Y., et al., *Trs85 is required for macroautophagy, pexophagy and cytoplasm to vacuole targeting in Yarrowia lipolytica and Saccharomyces cerevisiae*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 37-45.
175. Stromhaug, P.E., et al., *Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3553-3566.
176. Uttenweiler, A., H. Schwarz, and A. Mayer, *Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺-independent function*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33289-33297.
177. Schubert, C., et al., *Shp1 und Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation*. EMBO Rep, 2004. **5**: p. 818-824.
178. Darsow, T., S.E. Rieder, and S.D. Emr, *A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole*. J Cell Biol, 1997. **138**(517-529).
179. Fischer von Mollard, G. and T.H. Stevens, *The Saccharomyces cerevisiae v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(6): p. 1719-1732.
180. Wang, C.W. and D.J. Klionsky, *The molecular mechanism of autophagy*. Mol Med, 2003. **9**(3-4): p. 65-76.

181. Wang, C.W., et al., *Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage*. J Cell Biol, 2003. **163**(5): p. 973-985.
182. Kweon, Y., et al., *Ykt6p is a multifunctional yeast R-SNARE that is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(5): p. 1868-1881.
183. Legesse-Miller, A., et al., *Aut7p, a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane trafficking processes*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 32966-32973.
184. Reese, C., F. Heise, and A. Mayer, *Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion*. Nature, 2005. **436**: p. 410-414.
185. Muller, O., et al., *Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 6): p. 1107-1115.
186. Cohen, A., et al., *A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 26885-26893.
187. Sattler, T. and A. Mayer, *Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation*. J Cell Biol, 2000. **151**: p. 529-538.
188. Fry, M.R., et al., *Early and late molecular events of glucose-induced pexophagy in Pichia pastoris require Vac8*. Autophagy, 2006. **2**(4): p. 280-288.
189. Oku, M., et al., *Role of Vac8 in formation of the vacuolar sequestering membrane during micropexophagy*. Autophagy, 2006. **2**(4): p. 272-279.
190. Ano, Y., et al., *A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(2): p. 446-457.
191. Mukaiyama, H., et al., *Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy*. Genes Cells, 2003. **7**(1): p. 75-90.
192. Bernales, S., S. Schuck, and P. Walter, *ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum*. Autophagy, 2007. **3**(3): p. 285-287.
193. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(6): p. 279-285.
194. Bernales, S., K.L. McDonald, and P. Walter, *Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response*. PLoS Biol, 2006. **4**(12): p. e423.
195. Hammond, C. and A. Helenius, *Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 41-52.
196. Spektrumverlag, *Lexikon der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH, München, 2000.
197. Teter, S.A., et al., *Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 2083-2087.
198. Chang, A., et al., *Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 20562-20571.
199. Theos, A.C., et al., *A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis*. Dev Cell, 2006. **10**(3): p. 343-354.

200. Hein, C., et al., *NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 und Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase*. Mol Microbiol., 1995. **18**: p. 77-87.
201. Curtiss, M., C. Jones, and M. Babst, *Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 636-645.
202. Oestreich, A.J., et al., *Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 646-657.

DANKSAGUNG

Dankbarkeit macht das Leben erst reich. Man überschätzt wohl leicht das eigene Wirken und Tun in seiner Wichtigkeit gegenüber dem, was man nur durch andere geworden ist.

Dietrich Bonhoeffer

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Thumm für die Überlassung des interessanten Themas, die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. von Figura für die freundliche Übernahme des Referates für diese Promotion.

Herrn Prof. Dr. Braus danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Dr. Eeva-Lisa Eskelinen und Dr. Dirk Wenzel gilt mein Dank für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Ich danke all meinen Kollegen, die mich während meiner Zeit im Labor begleitet haben für die gute Zusammenarbeit: der „Lysegruppe“ Anika, Tanja, Ulrike und insbesondere Petra für ihren unermüdlichen Einsatz, auch außerhalb der Forschung. Ebenso danke ich Fotini, Jörn, Roswitha, Sandra und Sebastian für die netten und unvergesslichen Kaffeepausen. Katharina Hoppe danke ich für ihre Hilfe bei der Analyse der Sortiersignale im MVB-Weg und die angenehme Zeit im Praktikum.

Liebe Freunde haben neben der Forschung für die nötigen Erholungspausen gesorgt, auch Euch vielen Dank!

Von Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Mann Joachim. Immer zu wissen, dass ich bei Euch absoluten Rückhalt habe, hat mich sehr unterstützt und ermutigt!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Yvonne Mühe

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum und -ort: 25.06.1976 in Northeim

Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1982-1986	Grundschule Oberfeld
1986-1988	Orientierungsstufe Gieboldehausen
1988-1995	Eichsfeld-Gymnasium Duderstadt, Abschluss Abitur, Note 2,4

Ausbildung und Berufstätigkeit

1995-1997	Ausbildung zur staatl. gepr. biologisch-technischen Assistentin an der Chemieschule Göttingen, Note „sehr gut“
1997-1998	Biologisch-technische Assistentin im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August Universität zu Göttingen

Studium

1998-2003	Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
2000	Vordiplomsprüfungen, Note „sehr gut“
2001	Verleihung des Braunschweiger Bürgerpreises für herausragende studentische Leistungen
2002	Diplomprüfungen in den Fächern Botanik, Zellbiologie und Biochemie, Note „mit Auszeichnung“
2002-2003	Diplomarbeit in der Abteilung für Zell- und Molekularbiologie der Pflanze an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Note „sehr gut“

Promotion

2004-2007	Promotion im Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie der Georg-August Universität zu Göttingen
-----------	--