Charakterisierung Subtyp-spezifischer Autophagieproteine

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

vorgelegt von
Jörn Tolstrup
aus Cagliari/Italien

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. von Figura

Koreferent: Prof. Dr. Feußner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2009

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abbildungsverzeichnis	VI
III	Tabellenverzeichnis	VIII
IV	Abkürzungsverzeichnis	IX
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Der Modellorganismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2	Autophagie	4
2.2.1	Chaperon-vermittelte Autophagie	5
2.2.2	Mikroautophagie	6
2.2.3	Makroautophagie	6
2.2.4	Der <i>Cytoplasm to vacuole targeting</i> (Cvt)-Weg	6
2.2.5	Induktion von Cvt-Weg und Autophagie	7
2.3	Die Präautophagosomale Struktur - PAS	8
2.3.1	Vesikelbildung	9
2.4	Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) Vps34	10
2.5	Membranfusion	11
2.5.1	Lyse intravakuolärer Vesikel	13
2.6	Die homologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c	14
2.7	Orgellspezifische Autophagie	15
2.7.1	Pexophagie	15
2.7.2	Mitophagie	15
2.7.3	Mikroautophagischer Abbau des Zellkerns - PMN (<i>piecemeal microautophagy of the nucleus</i>)	16
2.7.4	ER-Phagie	17
2.8	Weitere wichtige Transportwege	18
2.8.1	Der frühe sekretorische Transportweg	18
2.8.2	Der MVB-Weg	19

2.8.3	Der Transport der Alkalischen Phosphatase - ALP	20
2.8.4	Transport der Carboxypeptidase Y - CPY	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Stämme	21
3.1.2	Bakterienstämme	24
3.1.3	Plasmide, Vektoren und Genbanken	25
3.1.4	Oligonukleotide	26
3.1.5	Antikörper	27
3.1.6	Kits	28
3.1.7	Enzyme und Puffer	28
3.1.8	Antibiotika	29
3.1.9	Nährmedien	29
3.1.9.1	Nährmedien für Hefen	29
3.1.9.2	Nährmedien für Bakterien	31
3.1.10	Chemikalien und Materialien	31
3.1.11	Geräte	35
3.2	Methoden	36
3.2.1	Zellkultur	36
3.2.1.1	Sterilisation von Lösungen und Verbrauchsmaterial	36
3.2.1.2	Zellkultur in Flüssigmedien	36
3.2.1.3	Zellanzucht auf Agar-Platten	36
3.2.1.4	Dauerkulturen	37
3.2.1.5	Hungerung von Hefezellen	37
3.2.1.6	Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen	37
3.2.1.7	Bestimmung des pH-Wertes von Flüssigkeiten	37
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.2.1	Vorbehandlung (Neutralisierung) von Glasperlen	38
3.2.2.2	Isolierung von DNA	38
3.2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen - <i>Plasmid Rescue</i>	38
3.2.2.2.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefezellen	38
3.2.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	39
3.2.2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.2.2.3	Transformation	40

3.2.2.3.1	Transformation von DNA in Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode	40
3.2.2.3.2	Transformation von DNA in Hefezellen „ <i>Quick and Dirty</i> “	40
3.2.2.3.3	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5α-Zellen	40
3.2.2.3.4	Kompetenztest von <i>E. coli</i> DH5α-Zellen	41
3.2.2.3.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> DH5α-Zellen	41
3.2.2.4	Gelelektrophorese von DNA	41
3.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	42
3.2.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	42
3.2.2.7	Restriktionsverdau von DNA	42
3.2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.2.2.9	Polymerasekettenreaktion - PCR	43
3.2.2.10	Reinigung von PCR-Produkten	45
3.2.2.11	PCR für Sequenzierungen	45
3.2.2.12	Verarbeitung von Sequenzdaten	46
3.2.3	Proteinchemische Methoden	46
3.2.3.1	Alkalische Lyse von Hefezellen	46
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – SDS-PAGE	46
3.2.3.3	Färbung mit colloidalem Coomassie	47
3.2.3.4	Western-Blot (<i>Semi-Dry</i> -Methode)	48
3.2.3.5	Immundetektion von Proteinen	48
3.2.3.6	Entfernung von Antikörpern von PVDF-Membranen	48
3.2.3.7	<i>Tandem Affinity Purification</i> – TAP	49
3.2.3.8	In-Gel-Verdau und MALDI-TOF Massenspektroskopie	51
3.2.3.9	Das Split-Ubiquitin System	52
3.2.3.10	<i>Screening</i> auf Platten mit Tunicamycin	53
3.2.3.11	CPY- <i>Overlay</i> -Assay mit GFP-Ygr223c und der Genbank AB320	53
3.2.4	Zellbiologische Methoden	54
3.2.4.1	Färbung der Vakuolenmembran mit FM4-64	54
3.2.4.2	Färbung des Zellkerns mit Hoechst 33342	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Split-Ubiquitin Screen von Atg21	55
4.1.1	Herstellung des Köderplasmids pCCW-Atg21	55
4.1.2	Co-Transformation von pCCW-Atg21 mit der Genbank NubGx	58
4.1.3	Untersuchung des Cvt-Phänotyps im <i>egd2Δ</i> -Stamm	65

4.2	Split-Ubiquitin <i>Screen</i> von Atg9	67
4.2.1	Herstellung des Köderplasmids pNCW-Atg9	67
4.2.2	Co-Transformation von pNCW-Atg9 mit der Genbank NubGx	69
4.3	Die Bedeutung des FRRG-Bindemotivs in den homologen Proteinen Atg18 und Atg21	72
4.4	Bedeutung der drei homologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c für die Vakuolenfragmentierung und -vererbung	74
4.4.1	Vakuolenfragmentierung	74
4.4.2	Vakuolenvererbung	77
4.4.3	Die Bedeutung des FRRG-Motivs in Atg18 bei der Vakuolenfragmentierung	79
4.5	Überexpression von GFP-YGR223C führt zur Sekretion von Carboxypeptidase Y (CPY)	82
4.5.1	Co-Transformation von WCG4a GFP-Ygr223c mit der Genbank AB320	84
4.6	Die Suche nach neuen Bindungspartnern für Trs85	86
4.7	Analyse des Wachstums von Autophagie-Mutanten unter ER-Stress	92
4.7.1	Analyse der durch ER-Stress induzierten Makroautophagie anhand des Abbaus von GFP-Atg8	95
4.7.2	Analyse der ER-Stress-induzierten Makroautophagie anhand des Abbaus von Pgk1-GFP	98
4.7.3	Sec61-GFP als Markerprotein für ER-Phagie	99
5	Diskussion	106
5.1	Suche nach Bindungspartnern von Atg9 und Atg21 mit dem Split-Ubiquitin System	106
5.1.1	Split-Ubiquitin <i>Screen</i> mit Atg9	107
5.1.2	Split-Ubiquitin <i>Screen</i> mit Atg21	108
5.1.3	<i>Egd2Δ</i> -Zellen zeigen keinen Cvt-Defekt	109
5.2	Das PIP-Bindemotiv FRRG in der Atg18 Proteinfamilie	109
5.2.1	Mutation von FRRG zu FTTG führt zur Misslokalisierung von Atg18 und Atg21	110

5.2.2	<i>Atg18Δ</i> zeigt einen schweren Defekt bei der Vakuolenfragmentierung	111
5.2.3	Bindung von Atg18 an PI(3,5)P ₂ ist wichtig für die Vakuolenfragmentierung	111
5.2.4	Deletionsstämme der Atg18 Proteinfamilie zeigen eine leichte Reduktion der Vakuolenvererbung	112
5.3	Überexpression von GFP-YGR223C führt zur Sekretion von CPY	112
5.3.1	Suche nach Bindungspartnern für Ygr223c	113
5.4	Suche nach Interaktionspartnern von Trs85 mit dem <i>Tandem Affinity Purification (TAP)</i>-System	114
5.4.1	Etablierung des TAP Systems mit Bet3-TAP	115
5.4.2	Anwendung TAP Systems mit Trs85-TAP	115
5.5	Analyse der spezifischen Autophagie des ERs: ER-Phagie	116
5.5.1	Viele Autophagie-relevante Proteine sind wichtig für das Zellwachstum unter ER-Stress	118
5.5.2	Analyse des Abbaus von GFP-Atg8 in verschiedenen Deletionsstämmen unter ER-Stress	120
5.5.3	Analyse des Pgc1-GFP-Abbaus in verschiedenen Deletionsstämmen unter ER-Stress	121
6	Literaturverzeichnis	123
7	Veröffentlichungen	146
Danksagung		
Lebenslauf		

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Vermehrungszyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	3
Abbildung 2.2:	Schema verschiedener autophagischer Transportwege und des Cvt-Weges.	5
Abbildung 2.3:	Regulation von Autophagie und Cvt-Weg durch die TOR-Kinase.	8
Abbildung 2.4:	Die beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme der Autophagie.	9
Abbildung 2.5:	Wanderung von Atg9 zwischen der PAS und einem peripheren Pool.	11
Abbildung 3.1:	Funktionsweise des Split-Ubiquitin Systems	52
Abbildung 4.1:	Überprüfung der Expression des Atg21-LexA-Fusionsproteins.	56
Abbildung 4.2:	Überprüfung der Komplementation der pCCW-ATG21-Konstrukte.	57
Abbildung 4.3:	Analyse der Ape1-Reifung im <i>egd2Δ</i> -Stamm.	66
Abbildung 4.4:	Lokalisation von GFP-Atg21 in <i>atg21Δ</i> - und <i>egd2Δ</i> -Zellen.	66
Abbildung 4.5:	Überprüfung der Expression in LexA-Atg9 Fusionsproteins.	68
Abbildung 4.6:	Überprüfung der Ape1-Reifung in <i>atg9Δ</i> mit pNCW-Atg9.	68
Abbildung 4.7:	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Lokalisation von GFP-Atg18 ^{FTTG} und Atg21 ^{FTTG} -GFP.	73
Abbildung 4.8:	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Fähigkeit verschiedener Mutanten zur Vakuolenfragmentierung.	75
Abbildung 4.9:	Quantifizierung der Vakuolenfragmentierung in verschiedenen Mutanten.	77
Abbildung 4.10:	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Fähigkeit von Hefezellen zur Vakuolenvererbung.	78
Abbildung 4.11:	Quantifizierung der Vakuolenvererbung in verschiedenen Deletionsmutanten.	79
Abbildung 4.12:	Einfluss des konservierten FRRG-Motivs von Atg18 auf die Vakuolenfragmentierung.	80

Abbildung 4.13: Quantifizierung der Vakuolenfragmentierung in den Stämmen <i>atg18Δ</i> transformiert mit Atg18-HA, <i>atg18Δ</i> mit Atg18 ^{FTTG} -HA und <i>atg18Δ</i> mit pRS315.	82
Abbildung 4.14: Sekretion von CPY bei Überexpression von GFP-YGR223C.	83
Abbildung 4.15: Sekretion von CPY bei Überexpression von GFP-YGR223C.	85
Abbildung 4.16: Coomassie-gefärbtes Gel des TRAPP-Komplexes.	87
Abbildung 4.17: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit Trs85 (1)	88
Abbildung 4.18: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit Trs85 (2).	89
Abbildung 4.19: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit BY4741 (wt), Bet3-Tap und Trs85-TAP ohne 2. Aufreinigungsschritt	90
Abbildung 4.20: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit Trs85 ohne 2. Aufreinigungsschritt	91
Abbildung 4.21: Verdünnungsreihen verschiedener Deletionsstämme auf Platten mit und ohne Tunicamycin (Teil 1).	94
Abbildung 4.22: Verdünnungsreihen verschiedener Deletionsstämme auf Platten mit und ohne Tunicamycin (Teil 2).	95
Abbildung 4.23: Analyse der ER-Stress-induzierten Makroautophagie am Abbau von GFP-Atg8.	97
Abbildung 4.24: Analyse der ER-Stress-induzierten Makroautophagie am Abbau von Pgk1-GFP.	99
Abbildung 4.25: Analyse des Abbaus von Sec61-GFP unter ER-Stress.	101
Abbildung 4.26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von Sec61-GFP in <i>S. cerevisiae</i> .	102
Abbildung 4.27: Analyse des ER-Abbaus mittels Sec61-GFP unter ER-Stress (Experiment 1).	103
Abbildung 4.28: Analyse des Abbaus von Sec61-GFP unter ER-Stress (Experiment 2).	104

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Hefestämme im BY4741-Hintergrund	21
Tabelle 3.2:	Hefestämme in anderen Hintergründen	24
Tabelle 3.3:	In dieser Arbeit eingesetzte <i>Escherichia coli</i> - Stämme	24
Tabelle 3.4:	Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide	25
Tabelle 3.5:	Liste der verwendeten Oligonukleotide	26
Tabelle 3.6:	In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper	27
Tabelle 3.7:	In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper	28
Tabelle 3.8:	Liste der verwendeten Kits	28
Tabelle 3.9:	Enzyme die in dieser Arbeit verwendet wurden	28
Tabelle 3.10:	Antibiotika die in dieser Arbeit verwendet wurden	29
Tabelle 3.11:	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Materialien	31
Tabelle 3.12:	In dieser Arbeit verwendete Geräte	35
Tabelle 3.13:	Amplifizierung von Sec61-GFP von chromosomaler DNA	43
Tabelle 3.14:	Amplifizierung von Atg21 von Plasmid-DNA	44
Tabelle 3.15:	Amplifizierung von Atg9 von chromosomaler DNA	44
Tabelle 3.16:	Amplifizierung von DNA für Sequenzierungen	45
Tabelle 3.17:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE	47
Tabelle 4.1:	Im Split-Ubiquitin <i>Screen</i> mit pCCW-Atg21 gefundene potentielle Interaktionspartner von Atg21.	59
Tabelle 4.2:	Im Split-Ubiquitin <i>Screen</i> mit pNCW-Atg9 gefundene potentielle Interaktionspartner von Atg9.	70
Tabelle 4.3:	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Vakuolenfragmentierung in verschiedenen Deletionsmutanten.	76
Tabelle 4.4:	Zusammenfassung der Vakuolenvererbung in verschiedenen Deletionsmutanten.	78
Tabelle 4.5:	Zusammenfassung der Vakuolenfragmentierung in verschiedenen Mutanten.	81
Tabelle 4.6:	Im <i>Screen</i> gefundene potentielle Interaktionspartner von GFP-Ygr223c.	86
Tabelle 4.7:	Liste der auf Tunicamycin-Sensitivität analysierten Stämme.	93

IV Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Ampere
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATG/Atg	Bezeichnung der Autophagie-Gene und -Proteine
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
cm	Zentimeter
Cvt	<i>Cytoplasm to vacuole targeting</i>
CM	Synthetisches Vollmedium
CPY	Carboxypeptidase Y
Da	Dalton
DMSO	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig/Doppelstrang-
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	(Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-Associated protein Degradation</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
<i>et al.</i>	et alii / et aliae: und andere
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethyl-amino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium

g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i>
k	Kilo (1×10^3)
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
Kan	Kanamycin
μ	Mikro (1×10^{-6})
μF	Mikrofarad; elektrische Kapazität
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
m	Milli (1×10^{-3})
ml	Milliliter
mM	Millimolar = mmol/l
Mat	<i>Mating type</i> , Paarungstyp
MeOH	Methanol
β-ME	β-Mercaptoethanol = 2-Mercaptoethanol
min	Minute(n)
MIPA	micropexophagic membrane apparatus
M	Molar (mol/l), molekulare Masse
MVB	<i>Multi vesicular body</i>
n	Nano (1×10^{-9})
N	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Ω	elektrischer Widerstand
ORF	<i>open reading frame</i> – Offener Leserahmen
P	Piko (1×10^{-9})
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Präautophagosomale Struktur
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Phosphatidylinositol
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol (3,5)-Bisphosphat
PI4P	Phosphatidylinositol 4-Phosphat
PI5P	Phosphatidylinositol 5-Phosphat
PIP(s)	Phosphatidylinositolphosphat(e)
PMN	<i>piecemeal microautophagy of the nucleus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVC	<i>Pre Vacuolar Compartment</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>synthetic defined</i> ; Synthetisches Medium
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> ; Natriumlaurylsulfat
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
ss	<i>single stranded</i> einzelsträngig/Einzelstrang-
s.u.	siehe unten
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TM	Tunicamycin
TRAPP	Transport Protein Particle
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehung pro Minute
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i> ; Glukose-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel

Nukleotidbasen

A	Purinbase Adenin
C	Pyrimidinbase Cytosin
G	Purinbase Guanin
T	Pyrimidinbase Thymidin

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 Zusammenfassung

Makroautophagie ist ein Prozess der eukaryotischen Organismen unter anderem das Überleben bei Nährstoffmangel sichert. Zytosolisches Material und Organellen werden dabei unspezifisch in doppelmembranlagige Autophagosomen verpackt und zur Vakuole (Lysosom) transportiert. Nach der Fusion der äußeren Vesikelmembran mit der Vakuolenmembran werden die inneren Vesikel ins Lumen freigesetzt. Anschließend werden die Vesikel lysiert und deren Inhalt abgebaut. Für Autophagie sind selektive Subtypen bekannt. Einer ist der Cvt (*Cytoplasm to vacuole targeting*)-Weg. Dieser ist unter Wachstumsbedingungen aktiv und transportiert spezifische Proteine unter Ausschluss von Zytosol in Cvt-Vesikeln zur Vakuole. Für ihre Funktion benötigen alle Subtypen eine spezifische Auswahl von Autophagie- und weiteren assoziierten Proteinen.

Mit Hilfe des Split-Ubiquitin System wurde in dieser Arbeit nach Interaktionspartnern für die Proteine Atg9 und das Atg21 gesucht. Für Atg9 ist bisher die Interaktion mit Atg2 bekannt. Im Split-Ubiquitin *Screen* mit Atg9 konnte jedoch kein zusätzlicher Interaktionspartner gefunden werden. Mögliche Interaktionen wurden vor allem mit Bestandteilen der ribosomalen 40S und 60S Untereinheit gefunden. Diese werden in der selektiven Ribophagie abgebaut. Unspezifische Interaktionen in diesem System scheinen auf Grund der räumlichen Nähe der Proteine bei diesem Prozess möglich.

Für Atg21, ein essentieller Bestandteil des Cvt-Wegs, wurde mit dem Split-Ubiquitin System neben vielen ribosomalen Proteinen auch Egd2 als möglicher Interaktionspartner entdeckt. *Egd2Δ*-Zellen zeigen jedoch keinen Cvt-Defekt. Die Lokalisierung von Atg21 ist in diesen Zellen ebenfalls nicht beeinträchtigt. Zudem zeigen *egd2Δ*-Zellen keinen Defekt bei der Vakuolenfragmentierung oder -vererbung.

Die drei sequenzhomologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c haben unterschiedliche Funktionen. Atg18 ist für Autophagie, Pexophagy, PMN (*piecemeal macroautophagy of the nucleus*) und den Cvt-Weg essentiell. Atg21 ist nur für den Cvt-Weg essentiell. Die Aktivität der Autophagie und PMN ist aber deutlich reduziert in *atg21Δ*-Zellen. Für *ygr223cΔ*-Zellen ist nur eine verminderte Aktivität bei PMN bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Vakuolenfragmentierung, als Antwort auf hyperosmotischen Stress, in *atg18Δ*-Zellen signifikant und *atg21Δ*-Zellen deutlich gestört ist. *Ygr223cΔ*-Zellen zeigen

hingegen den Wildtypphänotyp. Die Vererbung der Vakuole in knospenden Zellen ist dagegen in allen drei Deletionsstämmen reduziert. Den drei Proteinen gemein ist das Phosphatidylinositol-Phosphat (PIP)-Bindemotiv FRRG. Die Mutation zu FTTG in Atg18 und Atg21 führt zur fehlerhaften Lokalisierung in der Zelle. Zusätzlich verliert Atg18 die Fähigkeit an PI3P und PI(3,5)P2 zu binden. Dieses Motiv ist auch wichtig für die Fähigkeit zur Vakuolenfragmentierung. Atg18^{FTTG}-Zellen zeigen den gleichen Phänotyp wie *atg18Δ*-Zellen.

Die Überexpression von GFP-YGR223C bewirkt die Sekretion von CPY. Dies führte zur Annahme, dass überschüssiges Ygr223c einen unbekannten Faktor binden könnte, der für den CPY-Transport benötigt wird. Die gleichzeitige Überexpression dieses vermuteten Bindungspartners sollte den Defekt wieder aufheben. Allerdings konnte in einem CPY-*Overlay*-Assay mit Hilfe einer Überexpressions-Genbank kein solcher Faktor identifiziert werden.

Trs85 ist ein nicht-essentieller Bestandteil der TRAPP (*transport protein particle*)-Komplexe. In *trs85Δ*-Zellen ist der Cvt-Weg blockiert und Autophagie um 50% reduziert. Mit Hilfe der TAP (*tandem affinity purification*)-Methode sollte für Trs85 nach Bindungspartnern gesucht werden, um zu klären, ob Trs85 Bestandteil eines Cvt-spezifischen TRAPP Komplexes ist. Mit Bet3-TAP (als Kontrolle) konnte der TRAPP II Komplex fast vollständig isoliert werden. Für Trs58 konnten keine neuen Interaktionspartner identifiziert werden.

Das UPS (Ubiquitin-Proteasom System) und Autophagie sind die Hauptwege für den Proteinabbau in eukaryotischen Organismen. Die schnelle Adaption an die Bedürfnisse einer Zelle wird durch das UPS geregelt. Der selektive Abbau von Protein-Aggregaten sowie geschädigter oder überzähliger Organellen wird von der Autophagie gewährleistet. Induzierter ER-Stress durch Inkubation von Zellen in Tunicamycin (TM) oder Dithitritol (DTT) führt zur Induktion von ER-Phagie. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass viele zusätzliche Atg-Proteine und Autophagie-assoziierte Proteine essentiell für das Wachstum unter ER-Stress sind. Weitere Deletionsstämmen zeigten dazu eine signifikante Reduktion im Wachstum.

ER-Phagie scheint keine echte Makroautophagie zu sein. Die Markerproteine für Autophagie, GFP-Atg8 und Pgc1-GFP, wurden unter ER-Stress nicht in der Vakuole abgebaut. Experimente zur Identifizierung eines geeigneten Markerproteins für die Analyse der ER-Phagie zeigten, dass Kar2, Sec63 und Sec61 keine geeigneten Markerproteine sind.

2 Einleitung

2.1 Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*

Die einzellige Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört taxonomisch zur Familie der Sprosspilze. Sie weist die für Eukaryoten typischen Kompartimente auf wie Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Mitochondrien, Peroxisomen und die Vakuole, das zum Lysosom der Tierwelt analoge lytische Kompartiment.

Der Lebenszyklus umfasst eine haploide und eine diploide Vermehrungsphase. Diploide Zellen können nur aus zwei haploiden Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp (Mata oder Mata) gebildet werden. Die Vermehrung erfolgt durch mitotische Zellteilung, die auch als Sprossung oder Knospung bezeichnet wird (siehe Abbildung 1). Nährstoffmangel führt zur meiotischen Teilung der diploiden Zelle und zur Bildung eines Ascus, der vier haploide Ascosporen enthält.

Das haploide Hefegenom ist in 16 Chromosomen organisiert und enthält etwa 13 Millionen Basenpaare mit 6607 (*Saccharomyces* Genome Database: SGD 15.03.09) offenen Leserahmen. Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zeichnet sich durch die einfache genetische Manipulation des haploiden Genoms, die schnelle vegetative Vermehrung (Verdopplung unter idealen Bedingungen in 90min) und durch unkomplizierte Kultivierbarkeit aus. Zudem lassen sich viele zelluläre Prozesse auf höhere Eukaryoten übertragen (Guthrie und Fink, 1991).

Abbildung 2.1: Vermehrungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Autophagie

Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Entwicklung sowie die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bedürfen fortwährender Anpassung an das Gleichgewicht zwischen Proteinneusynthese und Proteinabbau (Yorimitsu und Klionsky, 2005b). Der Proteinabbau in eukaryotischen Zellen wird über zwei unterschiedliche Wege gewährleistet.

Das Proteasom sorgt unter normalen Wachstumsbedingungen für den Abbau nicht mehr benötigter oder falsch gefalteter Proteine im Zytosol und im Kern (Kostova und Wolf, 2003; Meusser *et al.*, 2005). Nährstoffmangel hingegen induziert Autophagie und führt zur Degradation von zytosolischen Proteinen bis hin zu ganzen Organellen. Die autophagische Proteolyse sichert somit durch die Wiederverwertung zelleigener Proteine und Organellen das Überleben der Zelle. Dabei ist es möglich, dass in einem Zeitraum von 24 Stunden neben Zellorganellen annähernd 50% der gesamten zytosolischen Proteine abgebaut werden und in Form von Aminosäuren und Lipidbausteinen der Zelle zur Verfügung stehen (Farre und Subramani, 2004).

Darüber hinaus ist die Autophagie an einer ganzen Reihe weiterer zellulärer Prozesse beteiligt. Dazu zählen Apoptose (Yu *et al.*, 2006), die Regulation der Organellenzahl (Monastyrska und Klionsky, 2006), diverse Entwicklungsprozesse (Levine und Klionsky, 2004) sowie die Lebensdauer von Zellen und Organismen (Übersicht siehe Vellai, 2009).

Außerdem spielt Autophagie bei vielen humanen Krankheiten eine Rolle wie z.B. bei der adaptiven Immunantwort (Schmid *et al.*, 2006), Kardiomyopathie (Tannous *et al.*, 2008; Terman und Brunk, 2005), neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington oder Parkinson (Übersicht siehe Lerena *et al.*, 2008; Shacka *et al.*, 2008), Infektionskrankheiten (Übersicht bei Orvedahl und Levine, 2009) sowie einigen Krebsarten (Gozuacik und Kimchi, 2004; Karantza-Wadsworth und White, 2007). Dabei scheint die Autophagie eine Rolle als Tumorsuppressor zu übernehmen (Huang und Klionsky, 2007). Onkogene Signalwege wie mTOR und Bcl2 scheinen als Inhibitoren für Autophagie zu wirken. Tumorsuppressor wie PTEN, TSC2 LKB1 und HIF1 α stimulieren hingegen Autophagie (Maiuri *et al.*, 2009). Zudem hat sich gezeigt, dass die humanen Autophagiegene BECLIN1 (ScVps30/Atg6), MAP1LC3 (ScAtg8) und ATG7/HsGSA7 (ScAtg7) verschiedenen Krebsarten fehlen (Jin, 2006).

Seit über 50 Jahren ist der Prozess der Autophagie bekannt und die beteiligten Proteine sind von der Hefe bis hin zu Säugetieren hochkonserviert, wurden aber weitgehend in Hefe charakterisiert (Klionsky *et al.*, 2003; Reggiori und Klionsky, 2002).

Autophagie lässt sich in *S. cerevisiae* durch Inkubation in Stickstoff-freiem Medium oder durch die Zugabe von Rapamycin, einem Inhibitor der TOR (Target Of Rapamycin)-Kinase (siehe 2.2.5), induzieren.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind drei unterschiedliche Arten der Autophagie bekannt: Chaperon-vermittelte Autophagie sowie Mikro- und Makroautophagie.

Abbildung 2.2: Schema verschiedener autophagischer Transportwege und des Cvt-Weges.

Dargestellt sind der Cvt-Weg sowie die Makro- und Mikroautophagie. Ape1: Aminopeptidase1; P: Peroxisom; PMN: *piecemeal microautophagy of the nucleus*. Modifiziert nach (Huang und Klionsky, 2007).

2.2.1 Chaperon-vermittelte Autophagie

Diese Art der Autophagie ist eine sekundäre Reaktion auf Nährstoffmangel in Säugerzellen und bislang nicht in Hefe bekannt (Klionsky, 2005; Stromhaug und Klionsky, 2001). Zytosolische Proteine werden mittels des Pentapeptid-Motivs

KFERQ zur lysosomalen Membran transportiert und dort durch einen Proteinkanal in das Lysosom transloziert (Massey *et al.*, 2004).

2.2.2 Mikroautophagie

Bei diesem Prozess wird zytosolisches Material oder ganze Organellen durch Membraneinstülpung des Lysosoms bzw. der Vakuole in das lytische Kompartiment transportiert. Dabei bilden sich Vesikel, die durch eine Lage vakuolärer Membran limitiert sind (Muller *et al.*, 2000). Die Mikroautophagie spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Membranhomöostase der Vakuole (Muller *et al.*, 2000). Spezielle Formen sind die aus *Pichia pastoris* bekannte Mikropexophagie, (siehe 2.7.1) und PMN (*piecemeal microautophagy of the nucleus*) (siehe 2.7.3), ein Prozess der in *S. cerevisiae* den mikroautophagischen Abbau des Zellkerns beinhaltet (Krick *et al.*, 2008b; Kvam und Goldfarb, 2007).

2.2.3 Makroautophagie

Nährstoffmangel führt zur Induktion von Makroautophagie. Dabei bilden sich 300-900nm große, von einer Doppelmembran umgebene Vesikel: die Autophagosomen (Takeshige *et al.*, 1992). Diese umschließen während ihrer Entstehung unspezifisch zytosolische Bestandteile und Zellorganellen (Klionsky, 2005). Die äußere der beiden Membranhüllen fusioniert schließlich mit dem lytischen Kompartiment und entlässt ein einlagiges autophagisches Vesikel in das Lumen. Das Vesikel wird lysiert und der Inhalt in der Vakuole abgebaut. Dieser Transportweg lässt sich in nach heutigem Wissen in vier Schritte unterteilen (Reggiori und Klionsky, 2005): Induktion (siehe 2.2.5), Vesikelbildung (siehe 2.3.1), Erkennung der Vakuole und Fusion mit deren Membran (siehe 2.5) und Lyse des autophagischen Vesikels mit anschließendem Abbau des Inhalts (siehe 2.5.1).

2.2.4 Der *Cytoplasm to vacuole targeting (Cvt)*-Weg

Viele der an Makroautophagie beteiligten Proteine sind auch Bestandteil des Cvt-Wegs.

Im Unterschied zur hungerinduzierten Autophagie ist der Cvt-Weg unter Wachstumsbedingungen aktiv. Über den Cvt-Weg werden selektiv die

Leucin-Exopeptidase Aminopeptidase 1 (Ape1) und die Hydrolase α -Mannosidase (Ams1) zur Vakuole transportiert (Hutchins und Klionsky, 2001; Klionsky, 1998; Klionsky und Ohsumi, 1999). Ape1 wird im Zytosol in einer ungereiften, inaktiven Vorläuferform (proApe1) synthetisiert (Klionsky *et al.*, 1992), die dann zuerst zu Homododekameren und schließlich zum Ape1-Komplex assemblieren (Kim *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 1996). Dieser Komplex bindet den Rezeptor Atg19 (Scott *et al.*, 2001) und bildet den sogenannten Cvt-Komplex (Baba *et al.*, 1997). Atg11, welches nicht für Autophagie benötigt wird (Shintani *et al.*, 2002), rekrutiert diesen an die Präautophagosomale Struktur (PAS). Nach Dissoziation von Atg11 wird der Cvt-Komplex durch Interaktion mit Atg19 und Atg8-PE in etwa 150nm große, von einer Doppelmembran limitierte, Cvt-Vesikel verpackt (Yorimitsu und Klionsky, 2005b). Nach Transport zur Vakuole fusioniert die äußere der beiden Membranhüllen mit dem lytischen Kompartiment und entlässt einlagige Vesikel in das Lumen. Diese Vesikel werden lysiert und proApe1 proteolytisch durch Proteinase A zur Ape1 gereift (Harding *et al.*, 1996).

Damit in der Vakuole auch bei Nährstoffmangel ausreichend Ape1 und Ams1 zur Verfügung stehen, werden diese Proteine auch über Autophagie zur Vakuole transportiert (Baba *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1996).

Für die an beiden Prozessen beteiligten Gene wird seit 2003 die einheitliche ATG-Nomenklatur benutzt (Klionsky *et al.*, 2003).

2.2.5 Induktion von Cvt-Weg und Autophagie

Die Induktion von Autophagie und Cvt-Weg wird über den Atg1-Atg13-Komplex und die TOR-Kinase reguliert.

Die TOR-Kinase reagiert auf ein verändertes Nährstoffangebot. Nährstoffreichtum führt zu erhöhter Kinaseaktivität und dadurch zur Hyperphosphorylierung von Atg13 (Scott *et al.*, 2000). Dies verringert die Affinität von Atg13 zur Serin/Threonin Kinase Atg1 und hemmt vermutlich die Autophagie während der Cvt-Weg aktiv ist (Kamada *et al.*, 2000).

Nährstoffmangel hingegen reduziert die Aktivität der TOR-Kinase. Dies führt zur partiellen Dephosphorylierung von Atg13 und zur Bildung des Atg1-Atg13-Komplex durch gesteigerte Affinität von Atg13 zu Atg1 (Kamada *et al.*, 2000; Noda und Ohsumi, 1998). Dieser Komplex interagiert neben Proteinen wie Atg20, Atg24 und Vac8 auch mit Atg17 und induziert dadurch Autophagie (Kabeya *et al.*, 2005). Unter Nährstoff-reichen Bedingungen interagiert der

Atg1-Atg13-Komplex mit Atg11, welches nur für den Cvt-Weg benötigt wird (Yorimitsu und Klionsky, 2005a).

Die Inhibition der TOR-Kinase führt zusätzlich zur Erhöhung der Atg8-Synthese, welches das bislang einzige Atg-Protein ist, dessen Neusynthese durch Hungerinduktion gesteigert wird (Huang *et al.*, 2000; Kirisako *et al.*, 1999).

Abbildung 2.3: Regulation von Autophagie und Cvt-Weg durch die TOR-Kinase.

Modifiziert nach (Yorimitsu und Klionsky, 2005b).

2.3 Die Präautophagosomale Struktur - PAS

Sowohl für die Autophagosomen, als auch für die Cvt-Vesikel gilt die PAS als zentrales Organisationszentrum für die Vesikelbiogenese (Klionsky, 2005). Bislang konnte für 20 von 31 Atg-Proteinen die Lokalisation an der PAS nachgewiesen werden. Von diesen sind wiederum 16 an der Bildung autophagischer Vesikel beteiligt (Suzuki *et al.*, 2007). Atg8 ist hierbei das einzige bekannte Atg-Protein, das in fertigen Autophagosomen oder Cvt-Vesikeln enthalten ist. Wie die PAS entsteht und woher die Bausteine für die Vesikelmembran kommen, ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Juhász und Neufeld, 2006).

2.3.1 Vesikelbildung

Die Vesikelbildung wird von dem Ubiquitin-ähnlichen Atg12-Atg5-Konjugationssystem initiiert. Zuerst bindet Atg7, ein dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 homologen Protein, an Atg12. Dadurch wird Atg12 aktiviert und auf das E2-ähnliche Atg10 übertragen, welches die Konjugation von Atg12 und Atg5 vermittelt (Kim *et al.*, 1999; Tanida *et al.*, 1999). Atg5 wechselwirkt mit homooligomerisierten Atg16, was zur Bildung eines multimeren Komplexes führt (Kuma *et al.*, 2002).

Abbildung 2.4: Die beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme der Autophagie.

Modifiziert nach (Yorimitsu und Klionsky, 2005b).

Mit Atg8-Phosphatidylethanolamin (PE) ist ein zweites Ubiquitin-ähnliches Konjugationssystem an der Vesikelbildung beteiligt. Atg4 spaltet das C-terminale Arginin von Atg8 ab. Atg8 wird über das zugänglich gewordene Glycin durch das E1-ähnliche Atg7 und das E2-ähnliche Atg3 auf PE übertragen (Ichimura *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1999; Kirisako *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 1999). Diese Verknüpfung ermöglicht Atg8 die Bindung an sowohl der äußeren, als auch an der inneren Membran der Autophagosomen bzw. Cvt-Vesikel. Atg8-Proteine an der äußeren zytosolischen Membran werden durch Atg4 abgespalten und können wiederverwertet werden. Die Atg8-Proteine, die an der inneren Membran mit in die Vakuole gelangen werden dort abgebaut. Fehlt Atg8-PE bei der Biogenese von Autophagosomen, so sind diese ungewöhnlich klein (Abeliovich *et al.*, 2000).

2.4 Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) Vps34

Vps34, die einzige bekannte PI3-Kinase in Hefe, ist für die Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) zuständig und in zwei funktionell unterschiedlichen Komplexen enthalten (Kihara *et al.*, 2001). Beide Komplexe bestehen aus Vps15, Vps30/Atg6 und Vps34 sowie einem weiteren, für den jeweiligen Komplex spezifischen, Protein. Komplex II enthält Vps38 und ist relevant für den Transport von Carboxypeptidase Y (CPY) vom Golgi-Apparat zur Vakuole, aber nicht für Autophagie (Kihara *et al.*, 2001).

Komplex I hingegen enthält Atg14 und ist an Autophagie und Cvt-Weg beteiligt. Die Lokalisation von Komplex I an der PAS fördert vermutlich die Anlagerung weiterer Atg-Proteine (Atg18, Atg20, Atg21, Atg20 und Atg27) an die Struktur (Nice *et al.*, 2002; Stromhaug *et al.*, 2004).

Wie erwähnt (siehe 2.2.5) befindet sich nur Atg8 an fertigen Autophagosomen bzw. Cvt-Vesikeln. Für Atg9, eines der integralen Membranproteine der beiden Transportwege (Lang *et al.*, 2000; Noda *et al.*, 2000), ist in Hefe bereits ein Recycling-Weg beschrieben von einem peripheren Pool zur PAS und zurück (Reggiori *et al.*, 2005b; Reggiori *et al.*, 2004).

Der anterograde Transport von Atg9 zur PAS erfolgt in Abhängigkeit von den Proteine Atg11, Atg23 und Atg27 sowie Aktin. Für den retrograden Transport von der PAS zum peripheren Pool werden der Atg1-Atg13-Komplex, der Atg2-Atg18-Komplex sowie der PI3-Kinase-Komplex benötigt (Reggiori *et al.*,

2005a; Yen *et al.*, 2007). Der von Atg2 und Atg18 gebildete Komplex ist an der Rekrutierung weiterer Proteine an die PAS beteiligt. Die Anlagerung des Komplexes an die PAS erfolgt durch die Bindung von Atg18 an PI3P und ist abhängig von der Anwesenheit von Atg1, Atg2, Atg9, Atg13 und Atg17 (Suzuki *et al.*, 2007).

Abbildung 2.5: Wanderung von Atg9 zwischen der PAS und einem peripheren Pool.

Modifiziert nach (He *et al.*, 2006).

2.5 Membranfusion

Intrazellulärer Transport von Proteinen über den sekretorischen Weg erfordert die Bildung von Vesikeln sowie deren zielgerichtete und kontrollierte Fusion mit der Zielmembran. Membranfusionen erfordern eine erhebliche Neuordnung von Lipiden beider beteiligten Membranen sowie die Aufnahme von vesikulären Membranproteinen in die Zielmembran (Wickner und Schekman, 2008).

Es werden zwei Arten von Fusionen unterschieden. Die Fusion zweier Vakuolen, die durch Studien *in vitro* näher untersucht wurde, ist ein Beispiel für eine

homotypische Membranfusion (Wickner und Haas, 2000). Die Fusion zwischen der äußeren Autophagosomen- bzw. Cvt-Vesikelmembran hingegen ist ein Beispiel für eine heterotypische Membranfusion (Ishihara *et al.*, 2001), die durch die Vesikel-vermittelte Interaktion zweier unterschiedlicher Organellen definiert ist (Wickner und Haas, 2000). Beide Fusionsprozesse verwenden ähnliche katalytische Elemente.

Zunächst wurde der N-Ethylmaleimid-sensitive Faktor (NSF), ein zur Familie der AAA ATPasen gehörendes Protein, charakterisiert (Glick und Rothman, 1987). Die Entdeckung des Hefe-homologs Sec18 war ein früher Hinweis darauf, dass die für Membranfusionen relevanten Proteine hoch konserviert sind (Wilson *et al.*, 1989). Bindungspartner für NSF ist sein Co-Chaperon α -SNAP (*soluble NSF association protein*) (Clary *et al.*, 1990), dessen Ortholog in Hefe das Protein Sec17 ist (Griff *et al.*, 1992).

Eine weitere Gruppe von Proteinen die für Membranfusionen essentiell sind, ist die Protein-Superfamilie der SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptor*) (Sollner *et al.*, 1993). SNAREs finden sich in allen eukaryotischen Organismen und sind wichtig für alle endo- und exozytotischen Transportwege (Wickner und Schekman, 2008).

Sie besitzen ein konserviertes, 60-70 Aminosäuren umfassendes SNARE-Motiv, das für die Bildung des, aus einem Bündel von vier parallelen α -Helices bestehenden, SNARE-Komplexes essentiell ist (Sutton *et al.*, 1998). Das Innere des Kernkomplexes wird aus hydrophoben Aminosäuren gebildet, mit Ausnahme des sogenannten „0-layer“. Dieser wird aus drei Glutaminen (Q) und einem Arginin (R) gebildet. Dies gab Anlass zur Q- bzw. R-SNARE-Nomenklatur (Fasshauer *et al.*, 1998). SNARE-Komplexe bestehen immer aus einem Qa-, einem Qb, einem Qc- und einem R-SNARE (Jahn und Scheller, 2006). SNAREs sind zumeist C-terminal in der Membran verankert, können aber auch über Prenylgruppen oder eine Phosphoinositid-Bindedomäne an die Membran gelagert sein (Cheever *et al.*, 2001). Weitere für Membranfusionen benötigte Proteine sind RabGTPasen (Wickner und Schekman, 2008) sowie SNARE-stabilisierende SM (Sec1/Munc18)-Proteine (Rizo und Sudhof, 2002).

Membranfusionen, hier als Beispiel die homotypische Vakuolenfusion, lassen sich in drei Abschnitte teilen:

1. ATP-abhängiges *Priming* trennt die cis-SNARE-Komplexe nach der Fusion durch Sec18 und Sec17 (Mayer *et al.*, 1996).
2. Das *Docking* erfordert die Aktivität der Rab-GTPase Ypt7. Zusätzlich wird noch der HOPS (*homotypic vacuole fusion and protein sorting; Vps Klasse C Proteine*)-*Tethering* Komplex benötigt (Stroupe *et al.*, 2006). Dieser bindet an Ypt7 und die SNAREs (Seals *et al.*, 2000). Die drei SNAREs in der Akzeptormembran formen unter Einfluss von SM-Proteinen einen Akzeptorkomplex mit dem das SNARE der anderen Membran einen trans-SNARE-Komplex bildet (Ungermann und Langosch, 2005).
3. Die Fusion findet vor allem in der so genannten Vertexregion statt (Fratti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). Der trans-SNARE-Komplex wird in der fusionierten Membran nun wieder zu einem cis-SNARE-Komplex.

Für die heterotypische Fusion von Autophagosomen bzw. Cvt-Vesikeln mit der Vakuolenmembran wurde die Beteiligung von Sec17 und Sec18, der SNAREs Vam3, Vam7 und Vti1 nachgewiesen. Zusätzlich sind Ypt7, Vps18 und das SM-Protein Vps33/Slp1 beteiligt (Ishihara *et al.*, 2001).

2.5.1 Lyse intravakuolärer Vesikel

Die Lyse intravakuolärer Vesikel ist abhängig von der putativen Lipase Atg15 (Epple *et al.*, 2001; Teter *et al.*, 2001), von Atg22 (Suriapranata *et al.*, 2000) sowie den Proteinasen A und B (Takeshige *et al.*, 1992). Abbau von Proteinen oder deren Reifung (z.B. Ape1) erfolgt durch vakuoläre Hydrolasen. Zellen ohne Atg15 oder Proteinase B sind defizient in der Lyse von Vesikeln in der Vakuole.

2.6 Die homologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c

Die beiden homologen Proteine Atg18 und Atg21 sind für den Cvt-Weg, aber nur Atg18 für Autophagie essentiell (Barth *et al.*, 2001, 2002; Dove *et al.*, 2004). Zudem wird Atg18 für PMN benötigt (siehe 2.7.3) während im *atg21Δ*-Stamm die PMN-Aktivität nur reduziert ist (Krick *et al.*, 2008b). Zur Funktion von Ygr223c ist bis heute lediglich bekannt, dass ein Fehlen des kodierten Proteins zu einer verminderten Autophagierate bei PMN führt (Krick *et al.*, 2008a). Atg18 und Atg21 sind an der PAS und an der Vakuolenmembran lokalisiert (Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004) und binden beide über das konservierte FRRG-Motiv sowohl an PI3P, als auch an Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P₂) (Dove *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004). Letzteres wird durch die Kinase Fab1 aus PI3P an der vakuolären Membran gebildet.

Zusätzlich zur Lokalisation an der Vakuole und der PAS ist für Atg18, Atg21 und Ygr223c die Lokalisation am Endosom gezeigt worden. Diese Lokalisation ist von Vps38 abhängig (Vps34-Komplex II) aber unabhängig von Atg14 (Vps34-Komplex I) (Krick *et al.*, 2008a). Einfach- oder Mehrfachdeletionen (unabhängig von der Kombination) der drei homologen Gene zeigen keine Auswirkung auf den CPY-Transport oder den MVB-Weg. Überexpression von *ATG21* führt hingegen zur Sekretion von CPY (Krick *et al.*, 2008a).

Die Fähigkeit von Atg18, über PI(3,5)P₂ an die Vakuole zu binden, ist essentiell für den retrograden Transport von der Vakuole zum späten Endosom. Die Deletion von *ATG18* führt zu einer unnatürlich großen Vakuole, wie sie auch aus *fab1Δ*-Zellen bekannt ist (Dove *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 1995).

Durch Mutation des FRRG-Motivs zu FTTG verliert Atg18 die Fähigkeit PI3P und PI(3,5)P₂ zu binden. Dies führt zum Verlust von dessen Funktion während des Cvt-Wegs, verhindert den retrograden Transport von der Vakuole zum späten Endosom und führt zur Freisetzung des Proteins von der vakuolären Membran in das Zytosol (Dove *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2006; Stromhaug *et al.*, 2004).

Obwohl Atg18 und Atg21 über das FRRG-Motiv die gleichen Lipide zu binden vermögen, spielt Atg21 keine Rolle beim retrograden Transport. Zudem sind beide Proteine unterschiedlich an der Organisation der PAS beteiligt.

Wie in 2.3.1 erwähnt, bildet Atg18 zusammen mit Atg2 einen Komplex, der weitere Atg-Proteine zur PAS rekrutiert. Atg21 spielt dagegen eine Rolle bei der Rekrutierung von Atg8 und dem Atg5-Atg12-Konjugat zur PAS (Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004).

Die Mutation von FRRG zu FTTG in Atg21 führt zu einem partiellen Verlust der PIP-Bindung. Aber wie GFP-Atg18^{FTTG} verliert auch Atg21^{FTTG}-GFP seine Bindung an die Vakuole und lokalisiert diffus im Zytosol (Krick *et al.*, 2006).

2.7 Organellspezifische Autophagie

2.7.1 Pexophagie

Peroxisomen sind für den Lipidmetabolismus einer Zelle von Bedeutung (Farre und Subramani, 2004), wobei ihre Anzahl und Größe variabel an die physiologischen Bedingungen angepasst werden kann (Sakai und Subramani, 2000). Der Abbau von einzelnen Peroxisomen erfolgt dabei in erster Linie über Makropexophagie durch den Transport in Pexophagosomen (entsprechen Autophagosomen) zur Vakuole, wogegen Peroxisomencluster selektiv über Mikropexophagie in die Vakuole aufgenommen werden (Monastyrska und Klionsky, 2006; Mukaiyama *et al.*, 2002).

Beide Formen der Pexophagie wurden vor allem in den Hefen *Hansenula polymorpha* und *P. pastoris* näher charakterisiert. Neben einer ganzen Reihe von, aus *S. cerevisiae* bekannten, Atg-Proteinen sind weitere Proteine an Pexophagie beteiligt (Dunn *et al.*, 2005; Farre und Subramani, 2004; Sakai *et al.*, 2006).

Untersuchungen der Mikropexophagie in *P. pastoris* zeigten, dass sich im Laufe der Invagination der Vakuolenmembran eine Kappen-ähnliche, doppelmembranlagige Struktur bildet: das MIPA (*micropexophagic membrane apparatus*). Diese Struktur wird für die Fusion der sich um die Peroxisomen herumstülpenden Vakuolenmembran benötigt (Oku *et al.*, 2003).

In *S. cerevisiae* lässt sich die Anzahl von Peroxisomen durch Inkubation in Ölsäuremedium erhöhen (Hutchins *et al.*, 1999). Durch Stickstoffmangel in Gegenwart von Glukose sind Makro- und Mikropexophagy aktiv (Monastyrska *et al.*, 2004).

2.7.2 Mitophagie

Mitophagie in *S. cerevisiae* lässt sich durch die Verwendung von Nährmedien mit nicht-verwertbarer C-Quelle (z.B. Laktat) induzieren (Kissova *et al.*, 2004). Dagegen ist Mitophagy blockiert, wenn bei Hungerung die Mitochondrien für die

Verwertung der bereitgestellten C-Quelle essentiell sind (Kanki und Klionsky, 2008).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen deuten auf zwei unterschiedliche mikromitophagische Prozesse hin. Im Subtyp I werden Mitochondrien durch eine Einbuchtung der Vakuole zusammen mit zytosolischem Material eingeschlossen. Im Subtyp II hingegen werden nur Mitochondrien aufgenommen (Kissova *et al.*, 2007). Mitophagie benötigt die meisten Atg-Proteine einschließlich der Autophagie-spezifischen Proteine Atg9 und Atg17 sowie des Cvt-spezifischen Proteins Atg11, aber nicht den proApe1-Rezeptor Atg19 (Kanki und Klionsky, 2008; Kissova *et al.*, 2007). Uth1, ein Membranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran, wird nur für den Subtyp II benötigt (Kissova *et al.*, 2007). Dagegen scheint das Mitochondrienprotein Aup1 allgemein an der Mitophagie beteiligt zu sein (Tal *et al.*, 2007). Autophagischer Abbau von Mitochondrien erfolgt nicht nur unter Hunger. Aber wie überzählige und defekte Mitochondrien erkannt werden ist bisher nicht geklärt.

2.7.3 Mikroautophagischer Abbau des Zellkerns - PMN (*piecemeal microautophagy of the nucleus*)

PMN ist eine selektive Form von Mikroautophagie, bei der Teile des Zellkerns und des Nukleolus abgebaut werden. In *S. cerevisiae* ist die Kernhülle über besondere Kontaktstellen (NV-junction) mit der Vakuolenmembran verbunden. Die Bildung dieser Kontaktstellen erfolgt über die Interaktion der Proteine Nvj1 (Kernmembran) und Vac8 (Vakuolenmembran) (Pan *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2003). Nach Ausbildung dieser Kontaktstellen, folgt die Einstülpung der Vakuolenmembran und die Bildung von dreimembranlagigen Vesikeln. Diese werden in das vakuoläre Lumen freigesetzt, wo sie und ihr Inhalt abgebaut werden (Kvam und Goldfarb, 2007; Roberts *et al.*, 2003).

In *S. cerevisiae* lässt sich PMN durch Stickstoff- oder Glukosemangel sowie Rapamycin induzieren (Roberts *et al.*, 2003). Neueste Untersuchungen zeigten, dass für PMN eine Vielzahl der bekannten Autophagie- und Cvt-Proteine, sowie Proteine der homotypischen Vakuolenfusion wichtig sind (Krick *et al.*, 2008b).

2.7.4 ER-Phagie

Das ER ist der Ausgangspunkt für die meisten integralen Membranproteine und andere Proteine, die den sekretorischen Transportweg durchlaufen (Wickner und Schekman, 2005). Im ER erhalten die Proteine ihre richtige Konformation und werden bei Bedarf modifiziert. Dies geschieht über ER-gebundene Chaperone und andere modifizierende Enzyme. Nur Proteine, die korrekt gefaltet und modifiziert sind, verlassen das ER. Zu diesem Zweck kontrollieren Zellen neben der Anzahl an Chaperonen im ER und der Menge der importierten Proteine auch den Abbau ungefalteter Proteine (Ellgaard und Helenius, 2003; McCracken und Brodsky, 2005; van Anken und Braakman, 2005).

Hierfür zuständig ist die UPR (*unfolded protein response*), die in einem ER-zu-Nukleus Signalweg für Anpassung des ERs sorgt (Bernales *et al.*, 2006b). Primärer Sensor für ungefaltete Proteine ist die Kinase/Endoribonuklease Ire1 (Cox *et al.*, 1993; Credle *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 1993). Die zytosolische Endoribonuklease-Domäne von Ire1 wird aktiviert und entfernt ein Intron aus der mRNA HAC1, was zur Produktion des Transkriptionsaktivators Hac1 führt (Cox und Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996). Dieser aktiviert eine ganze Reihe von UPR Zielgenen, die wiederum die Anzahl von Chaperonen und modifizierenden Enzymen des ERs steigern. Zusätzlich wird die Aktivität von ERAD (*ER-Associated protein Degradation*) stimuliert (Friedlander *et al.*, 2000). Dies führt zur Retranslokation von ungefalteten bzw. falsch gefalteten Proteinen aus dem ER zurück ins Zytosol, dort zur Ubiquitinierung und letztendlich zum Abbau durch das Proteasom (Kostova und Wolf, 2003; Meusser *et al.*, 2005).

Zusätzlich kann die Autophagie-Maschinerie aktiviert werden, wenn die Kapazität des Proteasoms überschritten wird oder wenn falsch gefaltete Proteine im ER aggregieren und nicht mehr in das Zytosol transportiert werden können (Bernales *et al.*, 2006a; Kruse *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006)

Über die Existenz der ER-Phagie, die selektive Autophagie des Endoplasmatischen Retikulums, ist bisher weniger bekannt. ER-Stress wird durch Inkubation in Medium mit Dithiothreitol (löst Disulfidbrücken) oder Tunicamycin (verhindert Glykosylierung) induziert. Dadurch kommt es zur Proliferation des kortikalen ERs sowie zur Zunahme von Atg8. Zudem erhöht sich die Anzahl der PAS pro Zelle und die UPR wird induziert (Bernales *et al.*, 2006a; Yorimitsu *et al.*, 2006). Das UPR Protein Hac1 sowie einige Atg-Proteine (Atg1, Atg8, Atg9, Atg16,

Atg19 und Atg20) sind für das Überleben der Zellen unter starkem ER-Stress wichtig sind (Bernales *et al.*, 2006a).

Kontrovers ist der Abbau von GFP-Atg8 unter ER-Stress. Einer Studie zufolge führt ER-Stress nicht zum Abbau von GFP-Atg8 in der Vakuole. Eine weitere Studie hingegen belegt den Abbau von GFP-Atg8 (Bernales *et al.*, 2006a; Yorimitsu *et al.*, 2006).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Strukturen, die als ERAs (ER-containing Autohagosomes) bezeichnet wurden. Diese Strukturen beinhalten ER-Material. Die äußere Membran dieser ERAs ist dicht mit Ribosomen besetzt, das Innere der ERAs ist hingegen nahezu frei von Ribosomen. ER-Stress induziert die Atg8-abhängige Bildung der ERAs. Dabei scheint die Induktion der ER-Phagie einen zusätzlichen, Ire1-Hac1-unabhängigen Signalweg zu erfordern, da die Induktion von Hac1 nicht für Bildung der ERAs ausreicht. Fortdauernder ER-Stress führt dazu, dass die gebildeten ERAs erhalten bleiben. Die Fusion der ERAs mit der Vakuole erfolgt erst, wenn der ER-Stress abklingt (Bernales *et al.*, 2006a).

2.8 Weitere wichtige Transportwege

2.8.1 Der frühe sekretorische Transportweg

Der Transport von Proteinen vom rauen ER zum Golgi-Apparat wird auch als früher sekretorischer Transportweg bezeichnet. Ein funktioneller Teil dieses Transportwegs sind die TRAPP (TRAnsport Protein Particle)-Komplexe, die zuerst in Hefe beschrieben wurden (Sacher *et al.*, 2001). Sie sitzen am Golgi-Apparat, wo sie zur Erkennung von Vesikeln benötigt werden, die für die Fusion mit dem Golgi bestimmt sind (Barrowman *et al.*, 2000; Sacher *et al.*, 2001). TRAPP I, bestehend aus den sieben Proteinen Bet3, Bet5, Trs20, Trs23, Trs31, Trs33 und Trs85, ist am Transport vom ER zum Golgi beteiligt. TRAPP II enthält zusätzlich Trs65, Trs120 und Trs130 und spielt eine Rolle beim Transport aus dem frühen Golgi oder beim retrograden Transport vom späten Golgi (Sacher *et al.*, 2001). Von allen Proteinen der beiden Komplexe sind alle bis auf Trs33, Trs65 und Trs85 essentiell für das Überleben von Hefezellen (Sacher *et al.*, 2001).

In *trs85Δ*-Zellen ist der Cvt-Weg vollständig blockiert, während die Autophagierate halbiert ist (Meiling-Wesse *et al.*, 2005). Dies gilt ebenso für den VFT (*Vps Fifty-Three*)-Komplex. In *vps51Δ* und *vps52Δ* Zellen wurde gezeigt,

dass in elektronenmikroskopischen Bildern die Autophagosomen kleiner als in Wildtypzellen sind (Reggiori *et al.*, 2003). Zusätzlich zur Funktion im Cvt-Weg, konnte für Trs85 eine weitere für PMN gezeigt werden (Krick *et al.*, 2008b).

2.8.2 Der MVB-Weg

Der MVB-Weg ist ein weiterer Autophagie-unabhängiger Transportweg, der ausgehend vom Prävakuolären Kompartiment (spätes Endosom bzw. multivesikuläres Endosom = *multivesicular body*) Proteine zur Vakuole transportiert. Proteine, die für den Transport über den MVB-Weg vorgesehen sind, werden monoubiquitiniert (Babst *et al.*, 2002b; Katzmann *et al.*, 2001; Reggiori und Pelham, 2001). In Hefe wird dazu die E3 Ubiquitin Ligase Rsp5 benötigt (Katzmann *et al.*, 2004). Ubiquitin-unabhängiger Transport ist, wie z.B. im Falle von Atg15, möglich (Epple *et al.*, 2003; Epple *et al.*, 2001).

Die 50nm großen MVB-Vesikel entstehen durch Einstülpung und Abschnürung der Endosomenmembran. Die Bildung dieser Vesikel benötigt die Klasse E Vps-Proteine die zum Großteil die vier konservierten ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*)-Proteinkomplexe bilden (Übersicht siehe Saksena *et al.*, 2007). Diese Komplexe sind an der Sortierung und Bildung der MVB-Vesikel beteiligt (Babst, 2005; Babst *et al.*, 2002a; Babst *et al.*, 2002b; Katzmann *et al.*, 2001).

ESCRT-0 besteht aus Vps27 und Hse1. Dieser Komplex wird durch die Bindung von Vps27 an PI3P über dessen FYVE-Domäne an das Endosom rekrutiert (Misra und Hurley, 1999; Stahelin *et al.*, 2002). Der so an die Membran gebundene Komplex erkennt und bindet ubiquitinierte Proteine die für den Transport vorgesehen sind (Prag *et al.*, 2007). Außerdem wird der ESCRT-1-Komplex (Vps23, Vps28, Vps37 und Mvb12) durch Vps27 rekrutiert (Bache *et al.*, 2003; Bilodeau *et al.*, 2003; Katzmann *et al.*, 2003). Dieser Komplex bindet ebenso an monoubiquitinierte Proteine, wie auch ESCRT-II (Vps22, Vps25 und Vps36) (Slagsvold *et al.*, 2005; Teo *et al.*, 2004).

Die zu transportierenden Proteine werden durch Doa4 deubiquitiniert (Amerik und Hochstrasser, 2004), um anschließend durch den ESCRT-III-Komplex (Vps20, Vps32/Snf7, Vps2 und Vps24) in die MVB-Vesikel verpackt zu werden. Die ESCRT-Komplexe werden durch die Aktivität von Vps4 getrennt, bevor die MVB-Vesikel abgeschnürt werden (Hurley und Emr, 2006).

Zusammen mit Vps4 und Fab1 werden Teile der ESCRT-Komplexe für Autophagie benötigt (Rusten *et al.*, 2007).

2.8.3 Der Transport der Alkalischen Phosphatase - ALP

Die Alkalische Phosphatase wird Endosom-unabhängig über den sekretorischen Weg vom Golgi-Apparat zur Vakuole transportiert (Cowles *et al.*, 1997; Piper *et al.*, 1997). Die ALP wird dafür im Trans Golgi Netzwerk (TGN) in Clathrin-freie AP3 Adaptorprotein-Vesikel verpackt. Der AP3-Komplex besteht in *S. cerevisiae* aus den vier Untereinheiten $\beta 3$, δ , $\sigma 3$ und $\mu 3$ (Boehm und Bonifacino, 2001). Die N-terminale zytosolische Domäne des Proteins enthält für die Sortierung eine Signalsequenz (EQXXLL) die notwendig, aber auch ausreichend für den Transport ist (Cowles *et al.*, 1997; Klionsky und Emr, 1990). In der Vakuole wird das C-terminale Propeptid durch Proteinase A gespalten und die ALP aktiviert (Klionsky und Emr, 1989).

2.8.4 Transport der Carboxypeptidase Y - CPY

Die vakuoläre Hydrolase Carboxypeptidase Y (auch Proteinase C) wird als inaktive Proform synthetisiert. Im ER Lumen wird es nach Spaltung seiner N-terminalen Signalsequenz N-glykosiliert und phosphoryliert (Hashimoto *et al.*, 1981; Hasilik und Tanner, 1978). Dem folgt der Transport zum Golgi-Apparat und die Modifizierung mit weiteren Oligosacchariden. Danach verlässt die sogenannte p2-CPY-Form das trans-Golgi-Netzwerk TGN (auch *pre vacuolar compartment* = PVC). Dabei wird CPY durch Bindung an den Rezeptor Vps10 mittels eines vakuolären Lokalisierungssignals im N-terminalen Teil des Propetdids zur Vakuole transportiert (Deloche *et al.*, 2001; Valls *et al.*, 1990). In der Vakuole erfolgt dann die Reifung durch Proteinase B (Sorensen *et al.*, 1994).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* - Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Hefestämme im BY4741-Hintergrund

Stamm	Genotyp	Quelle
BY4741	Mata <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y00742	BY4741 Mata <i>atg16Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01247	BY4741 Mata <i>atg27Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01386	BY4741 Mata <i>atg24Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01530	BY4741 Mata <i>atg10Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01709	BY4741 Mata <i>tlg2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01773	BY4741 Mata <i>atg19Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01774	BY4741 Mata <i>yol083wΔ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01907	BY4741 Mata <i>ire1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01970	BY4741 Mata <i>atg2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y01989	BY4741 Mata <i>atg4Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02086	BY4741 Mata <i>atg29Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.

Stamm	Genotyp	Quelle
Y02098	BY4741 Mata <i>pep4Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02103	BY4741 Mata <i>atg5Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02132	BY4741 Mata <i>atg6Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02152	BY4741 Mata <i>atg21Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02362	BY4741 Mata <i>vam3Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02763	BY4741 Mata <i>vps28Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y02371	BY4741 Mata <i>trs33::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03104	BY4741 Mata <i>atg8Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03267	BY4741 Mata <i>atg14Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03357	BY4741 Mata <i>atg12Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03682	BY4741 Mata <i>vac1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03810	BY4741 Mata <i>atg20Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03847	BY4741 Mata <i>atg9Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y03961	BY4741 Mata <i>atg31Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y04042	BY4741 Mata <i>trs85Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y04138	BY4741 Mata <i>atg26Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y04318	BY4741 Mata <i>vps52Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y04462	BY4741 Mata <i>vps45Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.

Stamm	Genotyp	Quelle
Y04547	BY4741 Mata <i>atg1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y04578	BY4741 Mata <i>vam7Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y04796	BY4741 Mata <i>trs65Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05091	BY4741 Mata <i>vps51Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05381	BY4741 Mata <i>vps27Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05382	BY4741 Mata <i>atg3Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05468	BY4741 Mata <i>atg11Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05588	BY4741 Mata <i>vps4Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05600	BY4741 Mata <i>atg13Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05650	BY4741 Mata <i>hac1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05700	BY4741 Mata <i>atg18Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05789	BY4741 Mata <i>atg15Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y05876	BY4741 Mata <i>ygr223cΔ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y06026	BY4741 Mata <i>atg17Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y06034	BY4741 Mata <i>atg23Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y06422	BY4741 Mata <i>egd2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y06797	BY4741 Mata <i>vps53Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y06876	BY4741 Mata <i>atg22Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.

Stamm	Genotyp	Quelle
Y07080	BY4741 Mata <i>fab1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
Y07090	BY4741 Mata <i>atg7Δ::kanMX4</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
<i>atg21Δatg18Δ</i>	BY4741 Mata <i>atg21Δ::kan atg18Δ::HIS3</i>	(Krick <i>et al.</i> , 2008a)
<i>atg21Δygr223cΔ</i>	BY4741 Mata <i>atg21Δ::kan ygr223cΔ::LEU2</i>	(Krick <i>et al.</i> , 2008a)
<i>atg21Δatg18Δygr223cΔ</i>	BY4741 Mata <i>atg21Δ::kan atg18Δ::HIS3 ygr223cΔ::LEU2</i>	(Krick <i>et al.</i> , 2008a)

Tabelle 3.2: Hefestämme in anderen Hintergründen

Stamm	Genotyp	Quelle
Bet3-TAP	MATa <i>ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
NMY51	Mata <i>his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 ura3::(lexAop)8-lacZ ade2::(lexAop)8-ADE2 GAL4</i>	Dualsystems Biotech, Zürich, CH
Sec61-GFP	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 (S288C)</i>	Invitrogen; (Huh <i>et al.</i> , 2003)
Trs85-TAP	MATa <i>ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i>	Euroscarf Collection, Frankfurt a.M.
WCG4a	Mata <i>ura3 his3-11,15 leu2-3,112</i>	W. Heinemeyer

3.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit eingesetzte *Escherichia coli* - Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5α	F ⁺ /endA1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 (Φ80lacZΔM15)	(Hanahan und Meselson, 1983)

3.1.3 Plasmide, Vektoren und Genbänke

Tabelle 3.4: Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCCW	<i>CEN/ARS LEU2 CYC1</i> -Promotor Kloniervektor <i>KAN^R</i> Cub	Dualsystems Biotech, Zürich, CH
pNCW	<i>CEN/ARS LEU2 CYC1</i> -Promotor Kloniervektor <i>KAN^R</i> Cub	Dualsystems Biotech, Zürich, CH
pCCW-Atg21	<i>CEN/ARS LEU2 ATG21</i> -Cub <i>CYC1</i> - Promotor	diese Arbeit
pNCW-Atg9	<i>CEN/ARS LEU2</i> Cub- <i>ATG9 CYC1</i> - Promotor	diese Arbeit
pLexA	HIS3 LC3	(Fricke <i>et al.</i> , 2004)
pAI-Alg5	<i>2micron TRP1 ALG5</i> -NubI <i>ADH1</i> - Promotor Kontrollvektor (positiv)	Dualsystems Biotech, Zürich, CH
pDL2-Alg5	<i>2micron TRP1 ALG5</i> -NubG <i>ADH1</i> - Promotor Kontrollvektor (negativ)	Dualsystems Biotech, Zürich, CH
GFP-Atg18	<i>CEN6 URA3 GFP-ATG18 MET25</i> - Promotor in pUG36	(Dove <i>et al.</i> , 2004)
GFP-Atg18 ^{FTTG}	<i>CEN6 URA3 GFP-ATG18-FTTG MET25</i> - Promotor in pUG36	(Dove <i>et al.</i> , 2004)
GFP-Atg21	<i>CEN6 URA3 GFP-ATG21 MET25</i> - Promotor in pUG36	(Krick <i>et al.</i> , 2006)
GFP-Atg21 ^{FTTG}	<i>CEN6 URA3 GFP-ATG21-FTTG MET25</i> - Promotor in pUG36	(Krick <i>et al.</i> , 2006)
Atg18-HA	<i>CEN6 LEU2 ATG18-3HA ATG18</i> - Promotor in pRS315	(Barth <i>et al.</i> , 2001)
Atg18 ^{FTTG} -HA	<i>CEN6 LEU2 ATG18-FTTG-3HA ATG18</i> - Promotor in pRS315	(Krick <i>et al.</i> , 2006)
pRS315	<i>CEN6 LEU2</i> Kloniervektor <i>AMP^R</i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
GFP-Ygr223c	<i>CEN6 URA3 GFP-YGR223C MET25</i> - Promotor in pUG36	R. Krick
pUG36	<i>CEN6 URA3 yEGFP3</i> N-terminale Fusion Kloniervektor	U. Güldener
GFP-Atg8	<i>CEN6 URA3 GFP-ATG8</i> in pRS316	(Suzuki <i>et al.</i> , 2001)
Atg21-GFP	<i>CEN6 URA3 ATG21-3HA-eGFP ATG21</i> - Promotor in pRS316	(Krick <i>et al.</i> , 2006)

Plasmid	Beschreibung	Quelle
Atg21 ^{FTTG} -GFP	<i>CEN6 URA3 ATG21-FTTG-3HA-eGFP</i> <i>ATG21</i> -Promotor in pRS316	(Krick <i>et al.</i> , 2006)
Pgk1-GFP	<i>CEN6 URA3 PGK1-GFP</i> <i>PGK1</i> -Promotor in pRS316	P. Schlotterhose
Sec61-GFP	<i>CEN6 HIS3 SEC61-GFP</i> nativer Promotor in pRS313	diese Arbeit
pRS313	<i>CEN6 HIS3</i> Kloniervektor <i>AMP^R</i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
pBR322	Plasmid zum Testen elektrokompetenter <i>E. coli</i> <i>AMP^R</i>	NEB, Frankfurt a. M.
YEpl3	<i>2micron LEU2</i> Kloniervektor <i>AMP^R</i> DNA-Genbankvektor DNA-Genbank AB320	(Nasmyth und Reed, 1980a), ATCC® Nummer: 37323™
pNubGx	<i>2micron TRP1 ADH1</i> -Promotor Kloniervektor <i>AMP^R</i> Nub cDNA- Genbankvektor	Dualsystems Biotech, Zürich, CH

3.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 3.5: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
pNCW-ATG9 f	5' aga tca gct ttg tcg acg gta tcg ata agc ttg ata tcg aat tcc tgc aga GAG AGA GAT GAA TAC CAG 3'
pNCW-ATG9 r	5' ata act aat tac atg acc tat taa gat ctg acg tca gcg ctc cgc gga agT TAT CTT CCG ACG TCA GAC 3'
Atg9-seq1 f	5' GAT GAT TCT GTG CCC AAA GTC 3'
Atg9-seq1 r	5' GAC TTT GGG CAC AGA ATC ATC 3'
Atg9-seq2 f	5' CTG AAT TTA TCC TTG CCT ATT CC 3'
Atg9-seq2 r	5' GGA ATA GGC AAG GAT AAA TTC AG 3'
Atg9-seq3 f	5' GCG ATT CAT TTC TCA ACA ATA AG 3'
Atg9-seq3 r	5' CTT ATT GTT GAG AAA TGA ATC GC 3'
pCCW-ATG21 f	5' tac ttc tat aga cac gca aac aca aat aca cac act aat cta gac aaa aAT GAA AGT ATT ACA ATT CAA TC 3'
pCCW-ATG21 r	5' taa gct tga tat cga att cct gca gat ata ccc atg gag gcc ttt TGT AAA TTT ATT ATT TTT AGT CAG C 3'

Oligonukleotid	Sequenz
Atg21-seq1 f	5' GTT TTC CCA CAT GAA ATT GTT G 3'
Atg21-seq1 r	5' CAA CAA TTT CAT GTG GGA AAA C 3'
Atg21-seq3 f	5' GAA ATA CCT CTC TCG AAA CC 3'
Atg21-seq3 r	5' GGT TTC GAG AGA GGT ATT TC 3'
Atg21-seq4 f	5' GAA TCA CGG AAT AAT GAG GAG 3'
Atg21-seq5 r	5' GAT GGT AAA CTG CTT GCT AC 3'
YEp13seq1	5' CTA CTT GGA GCC ACT ATC GAC 3'
YEp13seq2	5' GCG CCG GTG ATG CCG GCC 3'
Sec61-GFP forward2	5' CGC AGA CTA GTC TAG TTT ATA TGT GGT CTT CTT ATG 3'
Sec61-GFP reverse	5' GGA GCG AAT TCC TAT TTG TAT AGT TCA TCC ATG CC 3'
Sec61-GFP Seq1	5' gat gtg ctg caa ggc gat taa g 3'
Sec61-GFP Seq2	5' GCT TGC ATC ATC TCT TGT TCT TC 3'
Sec61-GFP Seq3	5' GTT ACG GTG GTA ACG TAG TTT AG 3'
Sec61-GFP Seq4	5' CTG TAC TGG CTA CGT GCC ATG 3'
Sec61-GFP Seq5	5' GTC AAT TCC GGT CGT GGT AAG 3'
Sec61-GFP Seq6	5' CCA TTA ATG TCT TTA TCC GAA GC 3'
Sec61-GFP Seq7	5' GGT GGG TTT ACT AAG AAC CTC G 3'

3.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 aufgelistet. Zusätzlich aufgeführt ist die Verdünnung, in der die Antikörper in Western Blot Analysen eingesetzt wurden.

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-anti-ApeI (polyklonal)	1:5.000	Eurogentec, Belgien
Maus-anti-CPY (monoklonal)	1:10.000	Molecular Probes, Leiden, NL
Maus-anti-GFP (monoklonal)	1:2.500	Roche, Mannheim
Maus-anti-LexA (monoklonal)	1:5.000	Santa Cruz, USA
Maus-anti-PGK (monoklonal)	1:10.000	Molecular Probes, Leiden, NL
Maus-anti-TAP (monoklonal)	1:5.000	BioCat, Heidelberg

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Quelle
Anti-Kaninchen-HRPO-Konjugat	1:5.000	Medac, Hamburg
Anti-Maus-HRPO-Konjugat	1:10.000	Dianova, Hamburg

3.1.6 Kits

Tabelle 3.8: Liste der verwendeten Kits

Bezeichnung	Quelle
DUALmembrane kit 2/3	Dualsystems Biotech, Zürich, CH
ECL TM Kit	Amersham Biosciences, GB
Rodeo TM ECL	USB, Staufen
Expand Long Temperature PCR System	Roche, Mannheim
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Quiagen, Hilden
HISpeed [®] Plasmid Maxiprep Kit	Quiagen, Hilden
HISpeed [®] Plasmid Midiprep Kit	Quiagen, Hilden
Wizard [®] Plus SV Minipreps	Promega, Mannheim

3.1.7 Enzyme und Puffer

Tabelle 3.9: Enzyme die in dieser Arbeit verwendet wurden

Bezeichnung	Quelle
ACTEV TM Protease	Invitrogen, Karlsruhe
FideliTaq TM DNA Polymerase	USB, Staufen
Taq DNA Polymerase	NEB, Frankfurt a.M.
Vent DNA Polymerase	NEB, Frankfurt a.M.
T4 Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
Verwendete Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a.M.

3.1.8 Antibiotika

Tabelle 3.10: Antibiotika die in dieser Arbeit verwendet wurden

Bezeichnung	Quelle
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Geneticinsulfat G418 (Kanamycin)	Roth, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.9 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien und Medienzusätze wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Die Uracillösung wurde als einzige Ausnahme in 0,5% Natriumhydrogencarbonat angesetzt. Der pH wurde mit Salzsäure oder Natriumhydroxid auf den gewünschten Wert eingestellt.

Abschließend erfolgte die Sterilisation durch autoklavieren für 20min bei 121°C und 2bar Druck. Zur Herstellung fester Medien (Agarplatten) wurde der Nährlösung zusätzlich 2% Bacto[®]-Agar hinzugefügt. Hitzelabile Medienzusätze wie Antibiotika-Lösungen und die Tryptophanlösung wurden steril filtriert.

Alle nachfolgenden Prozentangaben beziehen sich auf Gewicht pro Volumen (w/v) oder Volumen pro Volumen (v/v).

3.1.9.1 Nährmedien für Hefen

Vollmedium YPD, pH 5,5:

1%	Bacto [®] Yeast Extract
2%	Bacto [®] Pepton
2%	D-Glucose

Stickstofffreies Medium SD(-N) zum Hungern von Hefekulturen:

0,17%	Yeast Nitrogen Base ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren
2,0%	D-Glucose

Synthetisches Vollmedium CM zur Selektion, pH 5,6:

0,67%	Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
2,0%	D-Glucose
0,0117%	L-Alanin
0,0117%	L-Arginin
0,0117%	L-Asparagin
0,0117%	L-Asparaginsäure
0,0117%	L-Cystein
0,0117%	L-Glutamin
0,0117%	L-Glutaminsäure
0,0117%	L-Glycin
0,0117%	L-Isoleucin
0,0117%	L-Methionin
0,0117%	L-Phenylalanin
0,0117%	L-Prolin
0,0117%	L-Serin
0,0117%	L-Threonin
0,0117%	L-Tyrosin
0,0117%	L-Valin
0,0117%	myo-Inosit
0,00117%	p-Aminobenzoessäure

Je nach benötigten Selektionsbedingungen wurden folgende Supplemente hinzugefügt:

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

3.1.9.2 Nährmedien für Bakterien

Vollmedium LB, pH 7,5:

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

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen wurde hinzugefügt:

75µg/ml	Ampicillin
50µg/ml	Kanamycin

SOC-Medium, pH 7,4

2,0%	Bacto® Trypton
0,5%	Hefeextrakt
0,4%	D-Glucose
10mM	Natriumchlorid
10mM	Magnesiumchlorid
10mM	Magnesiumsulfat
2,5mM	Kaliumchlorid

3.1.10 Chemikalien und Materialien

Tabelle 3.11: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Materialien

Bezeichnung	Quelle
Aceton	Roth, Karlsruhe
Adenin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Antipain	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aprotinin	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Bezeichnung	Quelle
<i>L</i> -Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto [®] -Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] -Peptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] -Tryptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] -Yeast Extract	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] -Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto [®] -Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids and w/o ammoniumsulfate	Becton Dickinson, Heidelberg
Benzamidin	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Calmoduli Affinity resin	Stratagene, Amsterdam, NL
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chymostatin	Merck, Darmstadt
Complete [™] Protease Inhibitor (mit oder ohne EDTA)	Roche, Mannheim
<i>L</i> -Cystein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deoxyadenosintriphosphat (dATP)	NEB, Frankfurt a. M.
Deoxycytidintriphosphat (dCTP)	NEB, Frankfurt a. M.
Deoxyguanosintriphosphat (dGTP)	NEB, Frankfurt a. M.
Deoxythymidintriphosphat (dTTP)	NEB, Frankfurt a. M.
Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard (TriDye 1kb DNA-Ladder)	NEB, Frankfurt a. M.
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EGTA	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Filterpapier GB 002 und GB 003	Heinemann, Göttingen
Formamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glasperlen	Schütt, Göttingen
<i>D</i> -Glukose	Roth, Karlsruhe
<i>L</i> -Glutamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>L</i> -Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Quelle
<i>L</i> -Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hering-Sperma-DNA	Promega, Mannheim
<i>L</i> -Histidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, NL
Hybond TM -P PVDF Membran	Amersham Biosciences, GB
Hybond TM ECL Nitocellulosemembran	Amersham Biosciences, GB
Imidazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IgG Sepharose TM 6 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Isobutanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>L</i> -Isoleucin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
<i>L</i> -Leucin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>L</i> -Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol (β -ME)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
<i>L</i> -Methionin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Riedel-De Haën, Seelze
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumddodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Quelle
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Roche, Mannheim
ortho-Phosphorsäure 85%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PEG 3350	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pepstatin A	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) Roti®-Phenol	Roth, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinmarker (Precision Plus Protein™ All Blue Standards)	Bio-Rad, München
Protogel, 30 % (w/v) Acrylamid:0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid <i>Stock Solution</i> (37,5:1)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Salzsäure 37%	Roth, Karlsruhe
Sequenzierpuffer	Applied Biosystems, Darmstadt
L-Serin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
D-Sorbit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sterilfilter 0,2µm	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter 125 ml und 500 ml	Schleicher & Schuell, Dassel
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
L-Threonin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	ICN Biomedicals, Aurora, USA
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20® und Tween 40®	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Uracil	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Valin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Gängige Verbrauchswaren wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Petrischalen etc. wurden von den Firmen Greiner Bio-One, Omnilab, Sarstedt und Schütt bezogen.

3.1.11 Geräte

Tabelle 3.12: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Bezeichnung	Quelle
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Axioscope2 Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Blockthermostat BT100	Kleinfeld-Labortechnik, Gehrden
Blotting-Apparatur	Ltf-Labortechnik, Wasserburg
37°C/60°C-Brutschrank	Hereaus, Hanau
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophoresekammern SDS-PAGE Mini Protean® 3	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
French® Pressure Cell Press	Sim-Aminco, New York, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentation	Canon, Krefeld
Laborschüttler für Kulturen	A. Kühner, Birsfelden, CH
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fuji/ Raytest, Straubenhardt
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Kelheim
Mikrowelle R939	Sharp, Hamburg
Millipore-Anlage	Millipore, Schwalbach
Multivortex IKA® VIBRAX VXR basic, TypVX2E	IKA, Staufen
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, Freiburg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Rotor JA 10	Beckman, Krefeld
Rotor Ti70	Beckman, Krefeld
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen 5415R, 5417C, 5804R	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Kelheim
OptimaTM L-90K Ultracentrifuge	Beckman, Krefeld
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, USA
Wasserbad SWB25	ThermoHaake, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Verbrauchsmaterial

Die Sterilisation von hitzestabilen Glasgefäßen erfolgte mittels Heißluftsterilisator für 3h bei 180°C. Plastikmaterial, Glaswaren in Verbindung mit Papierstopfen sowie Medien und Lösungen wurden durch Autoklavieren für 20-30min bei 121°C und 2bar dampfsterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

3.2.1.2 Zellkultur in Flüssigmedien

Zellkulturen in flüssigen Nährmedien wurden in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Größe des Gefäßes sollte dabei mindestens dem 5-fachen Volumen des Nährmediums entsprechen. Die Inkubation von Hefekulturen erfolgte für 12-24h bei 30°C und 220Upm auf einem Rundschüttler. Hefezellen wurden direkt von einer Agarplatte mittels sterilem Zahnstocher entnommen, in 5ml Nährmedium gegeben und für 16-18h inkubiert. Die erhaltene Vorkultur wurde dann zum Anlegen der Hauptkultur verwendet.

Bakterienkulturen wurden direkt von einer Agarplatte mittels sterilem Zahnstocher angeimpft, für 12-16h bei 37°C und 220Upm auf einem Rundschüttler inkubiert und direkt verwendet.

3.2.1.3 Zellanzucht auf Agar-Platten

Hefezellen aus der Dauerkultur wurden mit einem Rundholzstab entnommen, auf Agarplatten ausgestrichen und für 1-3 Tage bei 30°C inkubiert.

Hefetransformanden wurden auf CM-Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert und für 1-3 Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden anschließend auf einer frischen Agarplatte mit CM-Selektionsmedium ausgestrichen und wiederum für 1-3 Tage bei 30°C inkubiert.

Bakterientransformanden wurden auf LB-Agarplatten unter Selektionsdruck ausplattiert und für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert.

Generell konnten Agarplatten bei 4°C bis zu 30 Tage aufbewahrt werden.

3.2.1.4 Dauerkulturen

Für die Aufbewahrung von Hefezellen in einer Dauerkultur wurden 500µl einer stationär gewachsenen Hefekultur mit 500µl einer sterilen 30% (v/v) Glycerinlösung gemischt und bei -80°C gelagert.

Für Dauerkulturen von Bakterien wurden 500µl Kultur mit 500µl steriler 60%iger (v/v) Glycerinlösung gemischt und bei -80°C gelagert.

3.2.1.5 Hungerung von Hefezellen

Zunächst wurde die Zelldichte der jeweiligen Hauptkultur bestimmt (3.2.1.6). Die für den Versuch benötigte Zellzahl in OD₆₀₀ wurde entnommen, für 5min bei 2500Upm und RT zentrifugiert und in ein äquivalentes Volumen von SD-N-Hungermedium aufgenommen. Im Allgemeinen erfolgte eine Inkubation von 4h bei 30°C auf dem Rundschüttler.

3.2.1.6 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Die Zelldichte von flüssigen Hefekulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm (OD₆₀₀) bestimmt, wobei das verwendete Medium als Referenz diente. Außerhalb des linearen Messbereichs (OD₆₀₀ > 1) des Photometers wurden die Kulturen in entsprechendem Medium verdünnt. Die optische Dichte von OD₆₀₀ = 1 entspricht einer Zelldichte von etwa 3×10^7 Zellen pro ml.

3.2.1.7 Bestimmung des pH-Wertes von Flüssigkeiten

Der pH-Wert verwendeter Lösungen, Medien und Puffern wurde mit einem pH-Meter bei RT bestimmt. Nach der Kalibrierung des Messbereichs des pH-Meter mit definierten Lösungen, wurde der pH-Wert der betreffenden Lösung eingestellt. Hierzu wurden HCl, NaOH und HAc verwendet. Kaliumphosphat-Puffer wurde durch Titration von Kaliumdihydrogenphosphat gegen Dikaliumhydrogenphosphat auf den geforderten pH-Wert eingestellt.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Vorbehandlung (Neutralisierung) von Glasperlen

Die ~0,5mm großen Glasperlen wurden über Nacht unter Rühren in 10M HCl gereinigt und anschließend mit 0,1M Tris/HCl auf pH 7,5 äquilibriert. Nach dem Waschen wurden sie zusätzlich mit ddH₂O gewaschen und getrocknet.

3.2.2.2 Isolierung von DNA

3.2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen - *Plasmid Rescue*

1,5ml einer Übernacht-Kultur in Selektionsmedium wurden für 1min bei RT und 14000 Upm zentrifugiert, das Zellsediment mit 500µl gewaschen und in 200µl *Breaking*-Puffer pH 8,0 (100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 1% (w/v) SDS und 2% (v/v) TritonX-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl neutralisierten Glasperlen (~0,5mm) und 200µl Phenol/Chloroform-Lösung (50% (v/v) Phenol; 50% (v/v) Chloroform), wurden die Zellen 5min bei 37°C mittels Vortex aufgeschlossen. Danach wurden 200µl ddH₂O zugegeben und die Suspension für 5min bei RT und 14000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden aus der obersten Phase 100µl entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 280µl Ethanol (-20°C) und 10µl einer 3M Natriumacetat/Essigsäure-Lösung für 20min bei -80°C gefällt.

Nach Zentrifugieren für 10min bei 4°C und 14000 Upm wurde der Überstand entfernt und das DNA-Sediment einmalig mit 250µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und die DNA für 5 min bei 37°C getrocknet, in 30µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefezellen

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Hefezellen wurden 1,5ml einer für 16-18h über Nacht bei 30°C gewachsenen Zellsuspension einer Hefekultur entnommen. Die Probe wurde für 1min bei RT und 13000Upm zentrifugiert und anschließend einmalig mit 500µl ddH₂O gewaschen.

Das erhaltene Sediment wurde in 200µl Lysepuffer pH 8,0 (100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 1% (w/v) SDS und 2% (v/v) TritonX-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl neutralisierten Glasperlen (~0,5mm) und 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die Suspension viermal

abwechselnd für 1min mittels eines Vortex gemischt und 1min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 200µl ddH₂O dazugegeben und der komplette Ansatz für 10min bei RT und 13000Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 1ml eiskaltem Ethanol (absolut) gemischt, für 10min bei -20°C gefällt und bei 4°C für 10min und 13000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Sediment in 400µl ddH₂O und 3µl RNase A (1mg/ml) resuspendiert und für 5min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1ml eiskaltem Ethanol (absolut) und 10µl einer 5M Ammoniumacetatlösung wurde die DNA erneut für 10min bei -20°C gefällt, 10min bei 4°C und 13000Upm zentrifugiert und einmalig mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde der Überstand vollständig entfernt, die DNA bei 37°C getrocknet, in 30µl ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurden die Kits „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen und „Wizard® Plus SV Minipreps“ der Firma Promega verwendet. Größere Mengen Plasmid DNA wurden mittels der Kits „HISpeed® Plasmid Midiprep Kit“ und „HISpeed® Plasmid Maxiprep Kit“ der Firma Qiagen isoliert.

Die Isolierung erfolgte jeweils nach Angaben der Hersteller in den bereitgestellten Protokollen. Die erhaltene hochreine Plasmid-DNA wurde für PCR (3.2.2.9), Restriktionsanalysen (3.2.2.7) oder zur Transformation in Hefe (3.2.2.3.1/2) verwendet.

3.2.2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „QIAQuick® Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.3 Transformation

3.2.2.3.1 Transformation von DNA in Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode

Eine 50ml Hauptkultur (YPD-Medium) wurde aus einer logarithmisch gewachsenen Vorkultur (YPD-Medium) 1:10 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 angezogen. Die Zellen wurden für 5min bei RT mit 2000Upm, zweimal mit 50ml sterilem ddH₂O gewaschen und einmal mit 2,5ml LiOAc-Sorbitol-Puffer pH 7,5 (100mM Lithiumacetat, 1mM EDTA, 10mM Tris und 1M D-Sorbitol) gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin in 100µl LiOAc-Sorbitol-Puffer resuspendiert und für 15min bei 30°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in zwei 50µl Aliquots aufgeteilt und jeweils mit 300µl PEG-Li-TE-Puffer pH 8,0 (40% (w/v) PEG 3350, 100mM Lithiumacetat, 1mM EDTA, 10mM Tris) gemischt. Zu dieser Lösung wurden 5µl einzelsträngige Heringsperma-DNA (10mg/ml; denaturiert durch Inkubation bei 95°C für 5min) und 1-3µl der zu transformierenden DNA gegeben. Nach einer Inkubation für 30min bei 30°C folgte ein Hitzeschock für 15min bei 42°C. Die Zellen wurden für 1min bei 3000Upm und RT zentrifugiert, der Überstand entfernt, die Zellen in 50µl sterilem ddH₂O aufgenommen und auf CM-Selektionsplatten ausplattiert.

3.2.2.3.2 Transformation von DNA in Hefezellen „Quick and Dirty“

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde das entsprechende Zellmaterial einer Agarplatte entnommen und mit 300µl PEG-Li-TE-Puffer pH 8,0 (40% (w/v) PEG 3350, 100mM Lithiumacetat, 1mM EDTA, 10mM Tris), 5µl einzelsträngiger (denaturiert durch Inkubation bei 95°C für 5min) Heringsperma-DNA (10mg/ml) und 1-3µl der zu transformierenden DNA gemischt. Nachfolgend wurde wie im Kapitel 3.2.2.3.1 verfahren.

3.2.2.3.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* DH5α-Zellen

Eine 1l Hauptkultur (LB-Medium) wurde mit einer stationär gewachsenen 10ml Vorkultur (LB-Medium) des *E. coli*-Stammes DH5α 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann für 10-15min auf Eis abgekühlt und danach bei 4°C für 8min bei 6500Upm zentrifugiert. Nach drei Waschschritten mit sterilem eiskalten ddH₂O, zunächst

mit 1l, dann mit 500ml und zuletzt mit 20ml, wurden die Zellen mit 20ml eiskalten, sterilen 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Danach wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 2ml frischem 10% Glycerin aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden in 40µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.2.3.4 Kompetenztest von *E. coli* DH5α-Zellen

Um die Kompetenz der *E. coli* DH5α-Zellen zu testen, wurde ein Aliquot der Zellen mit 0,1µg des Plasmids pBR322 transformiert (3.2.2.3.5). Die Transformationsrate sollte bei 10^9 Zellen pro µg DNA liegen.

3.2.2.3.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* DH5α-Zellen

Für die Transformation mittels Elektroporation wurde ein 40µl Aliquot kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (3.2.2.3.3) auf Eis aufgetaut und dann mit 1-3µl Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde mit abgetrockneten Kontakten in den Elektroporator eingesetzt und der Elektroschock bei einer Kapazität von 25µF, einer Spannung von 2500V und einem Widerstand von 200Ω gegeben. Die Entladezeit sollte optimalerweise im Bereich von 5-6ms liegen.

Nach der Zugabe von 950µl SOC-Medium wurde die Suspension in ein frisches steriles Reaktionsgefäß gegeben und für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 3000Upm und RT für 1min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 50µl sterilem ddH₂O resuspendiert, auf einer LB-Selektionsplatte ausplattiert und für 12-16h bei 37°C angezogen.

3.2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Die Trennung nach der Größe der Fragmente erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes.

DNA-Proben wurden mit 10-fach DNA-Probenpuffer pH 8,0 (1M Tris/HCl, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt.

Zum Einsatz kamen, je nach den erwarteten Fragmentgrößen, Gele mit einem Anteil von 0,8% bis 1,5% (w/v) Agarose und 1µg/ml Ethidiumbromid. Die

Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer pH 8,1 (40mM Tris/Acetat, 2mM EDTA) und konstanter Gleichspannung in Bereichen von 80-120V für 20-30min.

Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurde zusätzlich der DNA-Standard „TriDye 1kb DNA Ladder“ getrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht und die Dokumentation durch Digitalkamera mit angeschlossenem Drucker.

3.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Vergleich der Bandenstärke mit dem DNA-Standard „TriDye 1kb DNA Ladder“ geschätzt.

3.2.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „QIAEX® II Gel Extraction Kit“ aus Agarosegelen extrahiert. Die Verwendung geschah nach Herstellerangaben.

3.2.2.7 Restriktionsverdau von DNA

DNA-Moleküle wurden durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Spaltungen wurden in 10µl bis 100µl Ansätzen durchgeführt.

1-5µl DNA-Lösung wurde mit 2-10U Restriktionsenzym/µg DNA und dem entsprechenden einfach konzentrierten Puffer gemischt. Die Inkubation erfolgte für mindestens drei Stunden bei optimaler Temperatur.

Zur Kontrolle wurden anschließend 2µl des Ansatzes mit 2µl 10-fach DNA-Probenpuffer (3.2.2.4) und 6µl ddH₂O gemischt und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Reinigung der DNA erfolgte über Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion (3.2.2.6) oder mit dem „QIAQuick® PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers.

3.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten in entsprechende Vektoren erfolgte in Ansätzen von 10-20µl. Dabei wurden 0,5-1µg Vektor- und *Insert*-DNA im Verhältnis 1:3 mit 1U T4 DNA-Ligase und einfach konzentriertem T4 DNA-Ligase-Puffer gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C für 16-18 Stunden.

3.2.2.9 Polymerasekettenreaktion - PCR

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde die PCR verwendet. Der Standard Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

5µl	10-fach PCR-Puffer
1µl	Matrizen-DNA
1µl	100pmol Primer 1
1µl	100pmol Primer 2
1µl	10mM dNTP-Mix
1µl	100mM MgSO ₂
1µl	Polymerase
39µl	ddH ₂ O

Die jeweilig mit dem geeigneten Puffer eingesetzte Polymerase, sowie Abweichungen vom Standard Ansatz, werden im Folgenden bei der Auflistung der einzelnen Protokolle genannt.

Amplifizierung von Sec61-GFP

Ansatz:

10µl	10-fach PCR-Puffer (für Fidelity™)
1µl	Sec61-GFP chromosomale DNA
1µl	100pmol Primer Sec61-GFP forward2
1µl	100pmol Primer Sec61-GFP reverse
1µl	10mM dNTP-Mix
1µl	100mM MgSO ₂
1µl	Fidelity™ DNA Polymerase
85µl	ddH ₂ O

Tabelle 3.13: Amplifizierung von Sec61-GFP von chromosomaler DNA

Wiederholungen	Denaturierung	Annealing	DNA-Synthese (Elongation)
1x	5min bei 95°C	40s bei 68°C	1min bei 72°C
28x	40s bei 95°C	40s bei 68°C	1min bei 72°C
1x	40s bei 95°C	40s bei 68°C	5min bei 72°C

Amplifizierung von Atg21 für Split-Ubiquitin

Ansatz:

10µl	10-fach PCR-Puffer (für Vent DANN Polymerase)
1µl	Matrizen-DNA (1:30 Verdünnung pRS316-ATG21-3HA)
1µl	100pmol Primer pCCW-Atg21 f
1µl	100pmol Primer pCCW-Atg21 r
1µl	10mM dNTP-Mix
1µl	100mM MgSO ₂
1µl	Vent DNA Polymerase
84µl	ddH ₂ O

Tabelle 3.14: Amplifizierung von Atg21 von Plasmid-DNA

Wiederholungen	Denaturierung	Annealing	DNA-Synthese (Elongation)
1x	5min bei 94°C	30s bei 54°C	3min bei 72°C
29x	30s bei 94°C	30s bei 54°C	3min bei 72°C
1x	30s bei 94°C	30s bei 54°C	12min bei 72°C

Amplifizierung von Atg9 für Split-Ubiquitin

Ansatz:

5µl	10-fach PCR-Puffer (Expand Long Template PCR System)
2µl	chromosomale-DNA
1µl	100pmol Primer pNCW-Atg9 f
1µl	100pmol Primer pNCW-Atg9 r
1µl	10mM dNTP-Mix
1µl	Polymerase-Mix (Expand Long Template PCR System)
39µl	ddH ₂ O

Tabelle 3.15: Amplifizierung von Atg9 von chromosomaler DNA

Wiederholungen	Denaturierung	Annealing	DNA-Synthese (Elongation)
1x	5min bei 94°C	30s bei 50°C	8min bei 68°C
29x	30s bei 94°C	30s bei 50°C	8min bei 68°C
1x	30s bei 94°C	30s bei 50°C	12min bei 68°C

3.2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten

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

3.2.2.11 PCR für Sequenzierungen

Die Überprüfung von DNA-Fragmenten auf Korrektheit der Sequenz erfolgte durch Sequenzierung. Folgender Ansatz wurde verwendet:

1,5µl Sequenzier-Puffer

1,5µl Sequenziermix (Polymerase, 30mM MgCl₂, fluoreszenzmarkierte dNTPs)

0,5µl Matrix-DNA

1,0µl 100pmol Primer 1

1,0µl 100pmol Primer 2

5,5µl ddH₂O

Die PCR wurde nach dem in Tabelle 3.16 genannten Protokoll durchgeführt. Das entstandene Produkt wurde anschließend durch Zugabe 50µl 95% Ethanol, 1µl 3M NaOH (pH 5,2), 1µl 125mM EDTA und einer Inkubation von 5min bei RT gereinigt. Nach Zentrifugation für 15min mit 13000Upm bei RT, wurde die DNA einmal mit 250µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5min mit 13000Upm bei RT zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde bei 37°C für 5min getrocknet und anschließend in 15µl Formamid aufgenommen.

Die Sequenzierung wurde von der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Georg-August-Universität in Göttingen durchgeführt.

Tabelle 3.16: Amplifizierung von DNA für Sequenzierungen

Wiederholungen	Denaturierung	Annealing	DNA-Synthese (Elongation)
25x	10s bei 96°C	15s bei 50°C	4min bei 60°C
1x	10s bei 96°C	15s bei 50°C	10min bei 60°C

3.2.2.12 Verarbeitung von Sequenzdaten

Das Erstellen von Plasmiden und das Auswählen geeigneter Primer erfolgte mit Hilfe des Programms „Gene Construction Kit™ Version 2.5 (Textco). Zur Auswertung von erhaltenen DNA-Sequenzdaten wurde das Programm „CodonCode Aligner“ Version 2.0.6 (CodonCode Corporation) verwendet.

Der Vergleich von Protein- bzw. DNA-Sequenzen erfolgte über eine BLAST Analyse über die Internetseite <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>. Im Feld „Choose the Appropriate BLAST Program“ wurde dazu ausgewählt, ob Protein oder DNA-Daten abgeglichen werden sollten.

3.2.3 Proteinchemische Methoden

3.2.3.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

Für die alkalische Lyse wurden je Kultur 1 (oder auch mehrere) OD₆₀₀-Zellen für 1min mit 13000Upm bei RT zentrifugiert, das Sediment in 1ml ddH₂O resuspendiert, mit 150µl Lyselösung (1,85M NaOH, 7,5% (v/v) β-ME) gemischt und unter mehrmaligen Mischen für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150µl 50% (w/v) TCA wurden die Proben gründlich gemischt, erneut für 10min auf Eis inkubiert und für 10min mit 13000Upm bei 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde das Proteinsediment zweimal mit 500µl Aceton (Zentrifugation 5min mit 13000Upm bei RT) gewaschen, für 5-10min bei 30°C getrocknet, in 50µl Laemmli-Puffer pH 6,8 (0,5M Tris; 6% (v/v) Glycerin; 1,7% (w/v) SDS; 0,002% (w/v) Bromphenolblau; 1% (v/v) β-ME vor Verwendung zufügen) aufgenommen und zuletzt für 15min bei 30°C geschüttelt. Zu gelbgefärbten Proben wurden 1-5µl 2M Tris bis zur erneuten blauen Färbung gegeben.

3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli in „Mini Protean III“ Elektrophoresekammer (BioRad) durchgeführt. Zum Einsatz kamen 10%ige Gele mit 5%igen Sammelgel (Tabelle 17) und Gradientengele von 4-15% der Firma Invitrogen. Als Proteinstandard wurde der „Precision Plus Protein™ All Blue Standard“ (Biorad) verwendet.

Nach dem Auftragen von 10-25µl der jeweiligen Proben wurden die Proteine in SDS-Laufpuffer (200mM Glycerin, 25mM Tris und 0,1% (w/v) SDS) bei einer Spannung von 150V separiert. Die Elektrophorese wurde beendet wenn die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel austrat. Das Gel wurde entnommen, Sammelgel von Trenngel getrennt und letzteres entweder mit colloidalem Coomassie gefärbt (3.2.3.3) oder für die Western-Blot Analyse (3.2.3.4) verwendet.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

Komponenten	Trenngel (10%)	Sammelgel
ddH ₂ O	1,95ml	3,05ml
1,5M Tris/Cl, pH 8,8	1,25ml	-
0,5M Tris/Cl, pH 6,8	-	1,25ml
Protogel	1,75ml	0,65ml
10% (w/v) SDS	50µl	50µl
10% (w/v) APS	50µl	50µl
TEMED	2,5µl	5µl

3.2.3.3 Färbung mit colloidalem Coomassie

Zur Färbung des SDS-Gels mit colloidalem Coomassie wurden die Proteine zunächst für mindestens 1h unter Schütteln in 100ml Fixierer (40% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure) im Gel fixiert. Nach zweimaligem Waschen für 10min in 100ml frischem ddH₂O wurden die Gele zum Färben der Proteine unter Schütteln über Nacht bei RT in Färbelösung (80% (v/v) Stammlösung (s.u.); 20% (v/v) Methanol) inkubiert. Das gefärbte Gel wurde in eine neue Schale überführt und mit Entfärber (1% (v/v) Essigsäure) gewaschen. Die Entfärbelösung wurde mehrmals getauscht, bis das übrige Gel entfärbt war. Das Gel konnte zur weiteren Verwendung bei 4°C in Entfärbelösung gelagert werden. Die Stammlösung (0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 2% (w/v) ortho-Phosphorsäure; 10% (w/v) Ammoniumsulfat) für mindestens 24 Stunden vor dem Benutzen durch Rühren mischen.

3.2.3.4 Western-Blot (*Semi-Dry-Methode*)

Nach der Separation von Proteinen durch SDS-PAGE (3.2.3.2) wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran elektrophoretisch übertragen. Dazu wurden zunächst drei Lagen Filterpapier (GB 58) in 1-fach Blotting-Puffer (20% (v/v) 5-fach Blotting-Puffer (72% (w/v) Glycin, 15% (w/v) Tris), 20% (v/v) MeOH und 60% (v/v) ddH₂O) getränkt und auf die Anode der Blotkammer gelegt.

Darauf wurde erst das Gel und anschließend die in Methanol equilibrierte PVDF-Membran gelegt. Zuletzt folgten drei weitere Lagen in Blotting-Puffer-getränktes Filterpapier. Letzte Luftblasen wurden entfernt, die Kathode aufgelegt, die Apparatur mit einem Gewicht von 5kg beschwert und das Netzgerät angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke (75mA pro Blot) für 90min.

3.2.3.5 Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran erfolgte durch Detektion mittels Antikörpern.

Die Membran wurde dafür für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 10% (w/v) Magermilch in 1-fach TBST-Puffer pH 7,6 (20mM Tris/HCl, 8% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) Tween 20) auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5min in 1-fach TBST wurde der Primärantikörper (Tabelle 6) hinzugegeben und die Membran für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran drei Mal für 5min in 1-fach TBST gewaschen und der Sekundärantikörper (Tabelle 3.7) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1h bei RT wurde die Membran sechs Mal mit 1-fach TBST gewaschen und anschließend mit ECL nach Angaben der Hersteller inkubiert.

Die Detektion der Chemilumineszenz der Antikörper erfolgte im LAS3000. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes AIDA (Advanced Image Data Analyzer)-Software Version 3.20.111 (Raytest).

3.2.3.6 Entfernung von Antikörpern von PVDF-Membranen

Für die Detektion von Proteinen mit einem weiteren Antikörper wurde die getrocknete PVDF-Membran für 5min in MeOH bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 5min mit 1-fach TBST gewaschen und für weitere 10min in 10% Essigsäure inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1-fach TBST für

jeweils 5min wurde der Primärantikörper hinzugegeben und weiter wie in 3.2.3.5 beschrieben verfahren.

3.2.3.7 Tandem Affinity Purification – TAP

Puffer A:

10mM	K-Hepes pH 7,9
10mM	KCl
5mM	MgCl ₂
0,5mM	DTT
0,5mM	PMSF
2mM	Benzamidin
2µM	Pepstatin
100µl	1000x Inhibitoren-Mix

Puffer D:

20mM	K-Hepes pH 7,9
50mM	KCl
0,2mM	EDTA pH 8,0
0,5mM	DTT
0,5mM	PMSF
2mM	Benzamidin
20%	Glycerol

Puffer IPP150:

10mM	Tris-HCl pH 8,0
100mM	NaCl
0,1%	NP-40

TEV Schneide-Puffer: modif. IPP150

10mM	Tris-HCl pH 8,0
100mM	NaCl
0,1%	NP-40
0,5mM	EDTA
1mM	DTT

IPP150 Calmodulin Binde-Puffer:

10mM	Tris-HCl pH 8,0
150mM	NaCl
0,1%	NP-40
10mM	β-ME
1mM	Magnesiumacetat
1mM	Imidazol
2mM	CaCl ₂

IPP150 Calmodulin Elutions-Puffer:

10mM	Tris-HCl pH 8,0
150mM	NaCl
0,1%	NP-40
10mM	β-ME
1mM	Magnesiumacetat
1mM	Imidazol
2mM	EGTA

Durchführung

2l Medium wurden in einem 5l-Kolben 1:25000 (80 µl) mit einer Vorkultur angeimpft und über Nacht auf einem Rundschüttler bei 30°C inkubiert (16-17h). Am nächsten Tag wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 2 - 3 geerntet. Dazu wurden die Zellen in Polypropylen Zentrifugen-Becher (500ml) gefüllt und 20min

bei 4000Upm und 4°C zentrifugiert. Die Sedimente aus den einzelnen Bechern wurden vereint und mit 500 ml ddH₂O gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 40 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert, in ein 50ml „Falcon“-Plastikröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (2500Upm für 15min bei 4°C).

Der Überstand wurde durch Abschütten verworfen, die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Alternativ konnte sofort mit der Extrakt-Präparation begonnen werden.

Extrakt-Präparation

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C oder möglichst kühlen Bedingungen ausgeführt.

Die Zellen wurden in einem Volumen frischem Puffer A resuspendiert. Zum Aufschließen der Zellen wurde die French-Press zunächst einmal mit 5 ml Puffer A gewaschen und anschließend die Zellen durch dreimaligen Durchlauf durch die French-Press bei einem Druck von 1000psi lysiert.

Dem Extrakt wurde dann 2M KCl zu einer Endkonzentration von 0.2 M KCl zugeben und das Lysat in kalte Ultrazentrifugen-Gefäße überführt (70Ti, Beckman). Anschließend wurde der Extrakt in einer Ultra-Zentrifuge mit 70Ti-Rotor, Beckman) für 35min bei 25.000g (=16000Upm) und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dann in frische Ultra-Zentrifugen-Gefäße überführt und 65min bei 100.000g (=32000Upm) und 4°C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation waren drei Phasen sichtbar: Die Lipid-Phase auf der Oberfläche, ein Sediment mit Zell-Trümmern und eine mittlere Phase mit Proteinen etc. Letztere wurde entnommen und gegen Puffer D dialysiert.

Dazu wurde vorher 30cm Dialyseschlauch mit ddH₂O aufgeköcht, für 30min bei RT abgekühlt und dann mindestens 30min bei 4°C in Puffer D äquilibriert.

Die Extrakt-Phase wurde in den Schlauch gegeben und 3h bei 4°C gegen 100x Volumen dialysiert (ca. 1000ml).

Der dialysierte Extrakt wurde in ein 50ml „Falcon“-Plastikröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Aufreinigung

Alle Binde- und Elutions-Schritte wurden in 0,8 x 4 cm Polypropylen Säulen (Bio-Rad, Hercules, CA) durchgeführt.

Zunächst wurden 200 µl IgG-Sepharose *Beads*-Suspension auf eine frische Säule gegeben und einmal mit 10 ml IPP150-Puffer gewaschen. Die Zusammensetzung des Extrakts wurde wie folgt eingestellt: 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 100mM NaCl und 0,1% NP-40. Danach wurde der Extrakt auf die Säule zu den gewaschenen *Beads* gegeben und 2h bei 4°C unter Rotieren auf eine Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Elution wurden die *Beads* dreimal mit je 10ml IPP150-Puffer und einmal mit 10ml TEV Schneide-Puffer gewaschen. Zum Spalten wurde 1ml TEV Schneide-Puffer inklusive 100 Units ACTEV™ Protease (Invitrogen: 10 U/µl) auf die *Beads* gegeben und für 2 Stunden bei 16°C rotieren lassen. Anschließend wurde erneut eluiert und das Eluat aufgefangen.

200 µl Calmodulin *Beads*-Suspension wurden auf eine frische Säule gegeben und einmal mit 10 ml IPP150 Calmodulin Binde-Puffer gewaschen. 3 ml IPP150 Calmodulin Binde-Puffer und 3 µl 1M CaCl₂ wurden mit dem aufgefangenen Eluat gemischt, auf die Säule mit Calmodulin *Beads* gegeben und bei 4°C für eine Stunde rotiert. Anschließend wurden die *Beads* dreimal mit 10ml IPP150 Calmodulin Binde-Puffer gewaschen und die Proteine mit 1ml IPP150 Calmodulin Elutions-Puffer eluiert.

Es folgte eine Fällung der Proteine mit TCA zur Konzentrierung der Probe. Dazu wurde der Probe 50% TCA zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben, die Lösung kurz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 10min bei 13000Upm und 4°C, wurden die Proteine zweimal mit 500 µl Aceton gewaschen (Zentrifugation für 5min bei RT und 13000Upm) und zuletzt in 25 µl Laemmli aufgenommen und für 15min auf einem Rüttler bei 30°C gelöst. Anschließend konnten die Proteinextrakte bei -20°C gelagert werden.

3.2.3.8 In-Gel-Verdau und MALDI-TOF Massenspektroskopie

Der In-Gel-Verdau mit anschließender MALDI-TOF Massenspektroskopie wurde von Nicole Eiselt aus der Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Schmidt im Institut für Biochemie II der Georg-August Universität Göttingen, Heinrich-Düker-Weg 12, in 37073 Göttingen durchgeführt.

3.2.3.9 Das Split-Ubiquitin System

Mit dem von N. Johnsson und A. Varshavsky entwickelten System (Johnsson und Varshavsky, 1994) ist es möglich Protein-Protein Wechselwirkungen, die für gängige Methoden, z.B. dem Hefe 2-Hybridssystem, schwer zugänglich sind, zu identifizieren. Dies gilt besonders für Membran- bzw. Membran-assoziierte Proteine.

Wichtiger funktioneller Bestandteil ist das stark konservierte Protein Ubiquitin.

Das native Ubiquitin kann in zwei Teile gespalten werden: die C-terminale Hälfte (Cub) und die N-terminale Hälfte (Nub); daher der Name Split-Ubiquitin. Beide Hälften haben eine Starke Affinität zueinander, was die Zusammenführung zum des Split-Ubiquitin ermöglicht.

Ein Protein (Köder), das mit der Cub-Hälfte fusioniert ist, kann so auf Wechselwirkungen mit Proteinen (Beute), die an die Nub-Hälfte fusioniert sind, hin untersucht werden. Interagiert das Köderprotein mit einem Beuteprotein, so fördert die räumliche Nähe die Wiederherstellung des Split-Ubiquitins. Dieses wird durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) erkannt und führt zur Abspaltung des Split-Ubiquitins und Freiwerden des Transkriptionsfaktors LexA-VP16 (Abbildung 3.1). Letzterer diffundiert in den Zellkern und aktiviert eine Reihe von Reportergenen, u.a. *HIS3* als Selektionsmarker.

Abbildung 3.1: Funktionsweise des Split-Ubiquitin Systems

Modifiziert nach (Stagljär und Fields, 2002).

Selektion erfolgt auf die Marker der Plasmide ohne Leucin (Köderplasmid) und ohne Tryptophan (Genbank-Vektor). Zur Einstellung der Stringenzbedingung, um falsch-positive Ereignisse zu minimieren, wird zusätzlich durch Selektion auf die induzierten Marker *HIS3* und *ADE2* eine Bedingung gesucht, bei der im Kontrollversuch ausschließlich Transformanten der Positivkontrolle, jedoch nicht der Negativkontrolle, wachsen. Zusätzlich kann durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) in verschiedenen Konzentrationen der *HIS3*-Marker geregelt werden. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts Imidazoleglycerol-Phosphat Dehydratase.

Für den *Screen* mit Atg21 wurde auf Platten ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin sowie mit 7,5mM 3-AT im Nährmedium selektioniert. Für Atg9 erfolgte die Selektion auf Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin.

In dieser Arbeit wurde das *DUALmembrane* Kit2 (sowie Bestandteile des Kit3) der Firma Dualsystems Biotech AG (Zürich, Schweiz) verwendet. Die Durchführung erfolgte genau nach der Arbeitsvorschrift der Firma Dualsystems.

3.2.3.10 Screening auf Platten mit Tunicamycin

Zellen wurden über Nacht angezogen (stationär), die OD₆₀₀ gemessen, 3 OD Zellen entnommen für 3min bei RT und 2500 Upm zentrifugiert und mit 1ml frischem ddH₂O gewaschen. Nach der anschließenden Zentrifugation für 3min bei RT und 2500 Upm wurden die Zellen in einer Verdünnungsreihe in 10er Schritten bis auf 1:10000 verdünnt. Von jedem Verdünnungsschritt wurden 5µl auf eine YPD-Platte mit 2,5µg/ml Tunicamycin und als Wachstumskontrolle auf eine YPD-Platte ohne Selektion getropft. Nach der Inkubation bei 30°C für 2-3 Tage wurden die Platten auf Wachstum der Stämme hin analysiert.

3.2.3.11 CPY-Overlay-Assay mit GFP-Ygr223c und der Genbank AB320

Zellen des Stammes WCG4a mit GFP-Ygr223c wurden mit der Genbank AB320 nach dem unter Punkt 3.2.2.3.1 beschriebenen Protokoll transformiert. Der gesamte Ansatz wurde auf insgesamt 60 Selektionsplatten ausplattiert. Von diesen Platten wurden Replika angefertigt. Anschließend wurde mit einem Zahnstocher an fünf verschiedenen Punkten eine geringe Menge Zellmaterial der Negativkontrolle (WCG4a mit pUG36-GFP und pRS315) und an einem Punkt

Material der Positivkontrolle (*vps28Δ* mit pUG36-GFP und pRS315) auf jede Platte gegeben. Auf die Zellen wurden Nitrocellulose-Membranen gelegt, um sekretierte Proteine aufzunehmen. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen entnommen und haftendes Zellmaterial mit Wasser entfernt. Die Detektion sekretierter CPY erfolgte durch Immundetektion (3.2.3.5) mit Anti-CPY-Antikörper. Durch einen Vergleich der Membran mit den Assay-Platten konnten Kolonien, die CPY nicht sekretieren, identifiziert werden.

3.2.4 Zellbiologische Methoden

3.2.4.1 Färbung der Vakuolenmembran mit FM4-64

Zellen wurden über Nacht bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ 0,5-0,8 inkubiert. 5 OD Zellen wurden entnommen, für 3min bei RT und 2500 Upm zentrifugiert und in 1ml frischem YPD resuspendiert. Dann wurden 2µl einer FM4-64-Lösung (1mg/ml in DMSO) der Kultur zugefügt. Nach einer Inkubation von 30min wurden die Zellen zweimal gewaschen (Zentrifugation für 3min bei RT und 2500 Upm). Die Zellen wurden dann in 3ml frischem Medium aufgenommen und für 1h bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Zellen direkt, unter Verwendung eines CY3-Filters, mikroskopiert werden.

3.2.4.2 Färbung des Zellekerns mit Hoechst 33342

Das Färben des Zellkerns erfolgte durch Zugabe von 10 µl einer 2mM Lösung des Farbstoffs Hoechst 33324 in die Kultur. Nach Inkubation für 15min bei 30°C und 220 Upm konnten die Zellen unter Verwendung des DAPI-Filters mikroskopiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Split-Ubiquitin Screen von Atg21

Atg18 und Atg21 sind homologe Proteine der autophagischen Maschinerie. Während beide Proteine wichtig für den Cvt-Weg sind, ist für Atg21 im Gegensatz zu Atg18 nicht essentiell für Autophagie (Barth *et al.*, 2001, 2002; Dove *et al.*, 2004). In *atg21Δ* ist die Autophagie-Rate deutlich reduziert verglichen mit dem Wildtyp (Meiling-Wesse *et al.*, 2004).

Beide Proteine sind peripher Membran-assoziiert und besitzen WD40 Domänen. Dies deutet auf Wechselwirkungen mit anderen Proteinen hin (Barth *et al.*, 2002; Dove *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2001). Für Atg18 konnten bereits mehrere Interaktionspartner identifiziert werden. So wurde gezeigt, dass Atg18 mit Atg2 interagiert (Obara *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte die Interaktion von Atg18 mit Vac17 gezeigt werden (Efe *et al.*, 2007). Für Atg21 ist bisher kein Interaktionspartner gefunden worden.

Um im Rahmen dieser Arbeit einen oder mehrere Bindungspartner für Atg21 zu finden, wurde ein Split-Ubiquitin Screen mit einer cDNA-Genbank, die das gesamte Hefegenom abdeckt (siehe 3.1.3), durchgeführt.

Während das Hefe 2-Hybridsystem nur auf Interaktionen im Nukleus beschränkt ist, unterliegt das Split-Ubiquitin System dieser Einschränkung nicht und ist zudem besonders geeignet für Membranproteine oder Membran-assoziierte Proteine wobei auch schwache Interaktionen detektierbar sind. Basierend auf dem ursprünglich von N. Johnsson und A. Varshavsky entwickelten System (Johnsson und Varshavsky, 1994), bietet die Firma Dualbiosystems ein vollständiges Kit an, welches in dieser Arbeit verwendet wurde (siehe 3.2.3.9).

4.1.1 Herstellung des Köderplasmids pCCW-Atg21

Zur Herstellung des für den Screen benötigten Köderplasmids wurde zunächst das 1487 bp große DNA-Fragment von *ATG21* durch PCR amplifiziert (siehe 3.2.2.9). Matrize für diese PCR war das Plasmid pRS316-ATG21-HA (Meiling-Wesse *et al.*, 2004). Die Integration des PCR-Fragments in den mit *Sfi*I linearisierten Vektor pCCW (C-terminale Fusion) erfolgte über homologe

Rekombination. Der Vektor besitzt einen *CYC1*-Promotor, das Resistenzgen *Kan^R* sowie das Markergen *LEU2* und ein *CEN4/ARS1*-Element.

In dem durch die homologe Rekombination entstandenen Plasmid pCCW-Atg21 ist *ATG21* C-terminal an die LexA-VP16-Cub Kasette gekoppelt.

Die Überprüfung des Konstrukts erfolgte mittels Sequenzierung. Im Anschluss erfolgte die Transformation des Konstruktes in den Stamm *atg21Δ*. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Nachweis von LexA überprüft. Dazu wurden wachsende Zellen der Stämme WCG4a (wt), *pep4Δ*, *atg21Δ* (Negativkontrolle), WCG4a mit einem LexA-Plasmid (Positivkontrolle) und vier Klone von *atg21Δ* transformiert mit pCCW-Atg21 durch alkalische Lyse (siehe 3.2.3.1) aufgeschlossen und die Proteinextrakte durch ein SDS-Gel separiert (siehe 3.2.3.2). Im folgenden Immunoblot (siehe 3.2.3.4/5) mit Antikörper gegen LexA wurde die Expression des Konstruktes überprüft. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, exprimiert Klon 1 von *atg21Δ* mit pCCW-Atg21 ein LexA-positives Protein. Die Größe des Proteins im Gel stimmt mit der erwarteten Größe des Atg21-LexA-Fusionsproteins überein.

Abbildung 4.1: Überprüfung der Expression des Atg21-LexA-Fusionsproteins.

Wachsende Zellen der Stämme WCG4a (wt), *pep4Δ*, *atg21Δ* als Negativkontrolle, WCG4a mit einem LexA-Plasmid als positivkontrolle und vier Klone von *atg21Δ* transformiert mit pCCW-Atg21 wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte im SDS-Gel separiert. Der Immunoblot mit Antikörper gegen LexA zeigt die Expression des Atg21-LexA Fusionsproteins in Klon 1 des Stammes *atg21Δ* mit pCCW-Atg21. **Atg21-LexA** (93 kDa); **LexA** (38 kDa)

Zusätzlich wurden die mit pCCW-Atg21 transformierten Klone 1-4 von *atg21Δ* auf die Komplementation des *atg21Δ*-Phänotyps hin analysiert. Dazu wurden von dem Immunoblot aus Abbildung 4.1 die gebundenen Antikörper entfernt (siehe 3.2.3.6). Im darauf folgenden Immunoblot mit Antikörper gegen Aminopeptidase I wurde dann die Reifung von proApe1 zu mApe1 überprüft. Die Fusionsproteine der Klone 1-4 sind biologisch aktiv und zeigen im *atg21Δ*-Stamm den Wildtyp-Phänotyp (Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2: Überprüfung der Komplementation der pCCW-Atg21- Konstrukte.

Von dem Immunoblot aus Abbildung 4.1 wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Der folgende Immunoblot mit Antiserum gegen Ape1 zeigt die Komplementation des *atg21Δ*-Phänotyps der Klone 1-4 durch pCCW-Atg21. **proApe1** (69 kDa); **mApe1** (57 kDa)

Für den *Screen* wurde Klon Nr.1 des Plasmids pCCW-Atg21 verwendet, da es das biologisch aktive Fusionsprotein exprimiert. Das Plasmid wurde daraufhin in den für den *Screen* verwendeten Stamm NMY51 transformiert.

Als weitere Kontrolle für den *Screen* wurde das Kontrollplasmid pAI-Alg5 in den Stamm NMY51 mit pCCW-Atg21 transformiert. Dieses Kontrollplasmid codiert für die N-terminale Hälfte des Ubiquitins (Nub). Die Co-Expression beider Plasmide führt zur Wiederherstellung des Split-Ubiquitins, der Freisetzung des Transkriptionsfaktors LexA-VP16 und zum Wachstum von Transformanten auf Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan (Selektion auf die Plasmide). Für die Negativkontrolle wurde das Plasmid pDL2-Alg5 ebenfalls in NMY51 mit pCCW-Atg21 transformiert, da pDL2-Alg5 eine Punktmutation in der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins enthält, welche eine Wechselwirkung mit der C-terminalen Hälfte verhindert.

Transformanten auf den Platten der Negativkontrolle deuten auf eine Selbstaktivierung des Köderplasmids hin.

4.1.2 Co-Transformation von pCCW-Atg21 mit der Genbank NubGx

Zur Identifikation neuer Interaktionspartner von Atg21 wurde in den Stamm NMY51 transformiert mit pCCW-Atg21 zusätzlich die Genbank NubGx transformiert. Der Vektor dieser Genbank enthält Fusionen aus der N-terminalen Ubiquitinhälfte (Nub) und 0,5-5 kB langen cDNA-Fragmenten die das gesamte Hefe-Genom abdecken.

Im gesamten Ansatz wurden $4,91 \times 10^6$ Kolonien untersucht, von denen 206 Kolonien verteilt auf 36 Selektionsplatten wuchsen. Von allen Kolonien wurde Plasmid-DNA durch *Plasmid Rescue* (siehe 3.2.2.2.1) aus den Hefezellen extrahiert und in *E. coli* transformiert. Nach der erneuten Extraktion der Plasmid-DNA aus *E. coli*, wurden zur Verifizierung der Interaktion die Plasmide in den Stamm NMY51 mit pCCW-Atg21 transformiert. 203 Transformanten zeigten weiterhin Wachstum auf den Selektionsplatten. Die enthaltenen Beute-Plasmide kodieren möglicherweise für Interaktionspartner von Atg21. Die in den Beute-Plasmiden enthaltenen cDNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung und BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Analyse mit Hilfe der SGD Datenbank (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>) Genen zugeordnet.

178 Klone konnten sequenziert und identifiziert werden. 85 Mal wurde das Gen *EGD2* gefunden, 25 Mal *RDN25-1/RDN37-1*, 21 Mal die Gene *HYP2/ANB1*, sechsmal *RPL9A/B*, fünfmal *CDC19*, je zweimal *HOR2*, *RPS29A/B* und *VTC1*. Jeweils einmal identifiziert wurden: *ATP4*, *BUD21*, *CGR1*, *CUP1-2*, *EFB1*, *ENO1*, *FBA1*, *HSC82*, *HTZ1*, *PGK1*, *PMP1*, *PRX1*, *RPL24A/B*, *RPL31A/B*, *RPL32*, *RPS1A/B*, *RPS6A/B*, *RPS7A/B*, *RPS11A/B*, *RPS24A/B*, *RPS30A*, *SBA1*, *TDH3*, *TEF1/2*, *TIF1/2*, *TIF11*, *VMA4*, *VMA10*, sowie *YPL225W* und *YPR158W-B*. Alle sequenzierten Klone sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

EGD2 wurde in 47% der sequenzierten Klone identifiziert. Diese Frequenz deutet auf eine physische Interaktion des codierten Proteins mit Atg21 hin. Das 18,7kDa große Protein ist die Alpha-Untereinheit des heteromeren *nascent polypeptide-associated complex* (NAC). Dieser Komplex ist unter anderem mit zytoplasmatischen Ribosomen assoziiert und an der Sortierung von Proteinen sowie deren Translokation beteiligt (George *et al.*, 1998; Reimann *et al.*, 1999;

Shi *et al.*, 1995). Die Charakterisierung des Proteins im Hinblick auf eine Funktion bei der Autophagie und des Cvt-Wegs ist im Abschnitt 4.1.3 beschrieben.

RDN25-1 codiert für die 25S rRNA (ribosomale RNA) der ribosomalen 60S Untereinheit und ist Teil des von *RDN37-1* codierten 35S rRNA Transkripts.

RPL9A/B, *RPL24A/B*, *RPL31A/B*, *RPL32*, *RPS1A/B*, *RPS6A/B*, *RPS7A/B*, *RPS11A/B*, *RPS24A/B* und *RPS30A* sind weitere Gene die für rRNAs oder ribosomale Proteine codieren und nicht weiter charakterisiert wurden. *HYP2* und *ANB1* codieren für den Translations Initiations Faktor eIF-5A.

Tabelle 4.1: Im Split-Ubiquitin Screen mit pCCW-Atg21 gefundene potentielle Interaktionspartner von Atg21.

Die mit „-“ bezeichneten Klone konnten nach zweimaligem Sequenzieren nicht identifiziert werden.

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
1	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
2	<i>EGD2</i>	VIII	487643-488250	α -Untereinheit des NAC
3	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
4	-	-	-	-
5	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455162	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464299	
6	-	-	-	-
7	<i>RPS30B</i>	XV	678091-678381	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
8	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455275	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464412	
9	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
10	<i>VMA10</i>	VIII	187082-187496	Untereinheit G der vakuolären H ⁺ ATPase
11	<i>CDC19</i>	I	72657-73455	Pyruvat Kinase
12	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488283	α -Untereinheit des NAC
13	<i>HYP2</i>	V	85621-86368	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
14	-	-	-	-
15	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
16	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454768-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463905-464266	
17	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
18	<i>EFB1</i>	I	142621-143212	Translations Elongations Faktor 1 β
19	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464266	
20	<i>EGD2</i>	VIII	487639-488275	α -Untereinheit des NAC

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
21	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454768-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463905-464266	
22	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
23	-	-	-	-
24	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
25	-	-	-	-
26	<i>HYP2</i>	V	85621-86297	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
27	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
28	<i>RPL9A</i>	VII	227649-228351	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL9B</i>	XIV	499666-500257	
29	<i>YPR158W-B</i>	XVI	848321-849037	Retrotransposon TYA Gag und TYB Pol Gene
30	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
31	<i>HYP2</i>	V	85621-86371	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
32	<i>RPS7A</i>	XV	506245-506841	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS7B</i>		443329-443820	
33	<i>HYP2</i>	V	85676-86365	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525374	
34	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488275	α -Untereinheit des NAC
35	<i>EGD2</i>	VIII	487643-488250	α -Untereinheit des NAC
36	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454813-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463950-464266	
37	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455166	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464303	
38	<i>RPS29B</i>	IV	340405-340819	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
39	<i>ATP4</i>	XVI	407947-408803	mitochondriale F1F0 ATP Synthase
40	<i>YPL225W</i>	XVI	125970-126573	Protein ohne bekannte Funktion
41	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
42	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
43	<i>HYP2</i>	V	85621-86368	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
44	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454803-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463940-464266	
45	<i>EGD2</i>	VIII	487663-488250	α -Untereinheit des NAC
46	<i>HYP2</i>	V	85621-86368	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
47	<i>RPL9A</i>	VII	227656-228233	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL9B</i>	XIV	499783-500337	
48	-	-	-	-
49	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464266	
50	<i>EGD2</i>	VIII	487639-488275	α -Untereinheit des NAC
51	<i>EGD2</i>	VIII	487640-488275	α -Untereinheit des NAC
52	<i>RPL32</i>	II	45969-46416	ribosomales Protein der 60S Untereinheit

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
53	<i>TEF1</i>	XVI	700581-701514	Translations Elongations Faktor 1a
	<i>TEF2</i>	II	477638-478614	
54	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
55	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488261	α -Untereinheit des NAC
56	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488268	α -Untereinheit des NAC
57	-	-	-	-
				ribosomales Protein L30 der 60S
58	<i>RPL24A</i>	VII	437608-437966	Untereinheit
	<i>RPL24B</i>	VII	787453-787802	
59	<i>HYP2</i>	V	85621-86367	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
60	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488274	α -Untereinheit des NAC
61	<i>HYP2</i>	V	85621-86373	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
62	<i>BUD21</i>	XV	472908-473162	Komponente des SSU Prozessosomes
63	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
64	<i>EGD2</i>	VIII	487640-488275	α -Untereinheit des NAC
65	<i>HYP2</i>	V	85621-86243	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
66	<i>HYP2</i>	V	85621-86365	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
67	<i>VMA4</i>	XV	943629-944404	Untereinheit E der V1 der V-ATPase
68	<i>HYP2</i>	V	85621-86243	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
69	<i>PRX1</i>	II	100304-1001194	mitochondriales Peroxiredoxin
70	<i>HYP2</i>	V	85621-86368	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
71	<i>HTZ1</i>	XV	303426-304069	Histonvariante H2AZ
72	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
73	<i>EGD2</i>	VIII	487654-488268	α -Untereinheit des NAC
74	<i>HYP2</i>	V	85621-86367	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
75	<i>EGD2</i>	VIII	487654-488268	α -Untereinheit des NAC
76	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
77	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488274	α -Untereinheit des NAC
78	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
79	-	-	-	-
80	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
81	<i>RPS11A</i>	IV	491860-492322	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS11b</i>	II	333375-334016	
82	<i>EGD2</i>	VIII	487640-488275	α -Untereinheit des NAC
83	<i>VTC1</i>	V	307775-303339	Vakuoläres Transporter Chaperone
84	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
85	<i>RPS1A</i>	XII	1017969-1018938	ribosomales Protein 10 der 40S Untereinheit
	<i>RPS1B</i>	XIII	146447-147303	

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
86	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454793-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463930-464266	
87	<i>CDC19</i>	I	72689-73453	Pyruvat Kinase
88	<i>PGK1</i>	III	138196-138307	3-Phosphoglyceratkinase
89	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
90	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454804-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463941-464266	
91	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC
92	<i>EGD2</i>	VIII	487644-488261	α -Untereinheit des NAC
93	<i>EGD2</i>	VIII	487642-488270	α -Untereinheit des NAC
94	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
95	<i>RPL9A</i>	VII	227631-228338	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL9B</i>	XIV	499678-500257	
96	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454825-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463962-464266	
97	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC
98	-	-	-	
99	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454799-455128	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463916-464265	
100	-	-	-	
101	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488274	α -Untereinheit des NAC
102	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488268	α -Untereinheit des NAC
103	-	-	-	-
104	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454779-455128	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463916-464265	
105	-	-	-	-
106	<i>RPL9A</i>	VII	227656-228351	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL9B</i>	XIV	499666-500257	
107	<i>SBA1</i>	XI	219939-220769	Co-Chaperon der Hsp90-Familie
108	<i>RPS29A</i>	Xii	898653-898892	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS29B</i>	IV	340624-340796	
109	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
110	<i>CGR1</i>	VII	440061-440204	Prozessiert pre-rRNAs der 60S Untereinheit
111	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC
112	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-455177	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464314	
113	-	-	-	-
114	<i>RPS24A</i>	V	306787-307269	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS24B</i>	IX	231478-231955	
115	<i>HYP2</i>	V	85621-86368	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
116	<i>RPL9A</i>	VII	227656-228351	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL9B</i>	XIV	499666-500344	
117	<i>EGD2</i>	VIII	487644-488261	α -Untereinheit des NAC
118	<i>CUP1-2</i>	VIII	214360-214779	Metallothionein

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
119	<i>HYP2</i>	V	85621-86363	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
120	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
121	<i>RPL9A</i>	VII	227641-228351	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL9B</i>	XIV	499666-500257	
122	<i>HYP2</i>	V	85621-86365	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
123	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488283	α -Untereinheit des NAC
124	-	-	-	-
125	-	-	-	-
126	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
127	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
128	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
129	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488275	α -Untereinheit des NAC
130	-	-	-	-
131	<i>HYP2</i>	V	85621-86372	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
132	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC
133	<i>HOR2</i>	V	279928-280706	DL-glycerol-3-phosphatase
134	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
135	<i>ENO1</i>	VII	1001598-1002361	Enolase I
	<i>ENO2</i>		451988-452762	Enolase II
136	<i>CDC19</i>	I	72644-73453	Pyruvat Kinase
137	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454801-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463938-464266	
138	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488275	α -Untereinheit des NAC
139	<i>EGD2</i>	VIII	487644-488268	α -Untereinheit des NAC
140	<i>EGD2</i>	VIII	487644-488261	α -Untereinheit des NAC
141	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC
142	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-455275	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464412	
143	<i>FBA1</i>	XI	326210-327151	Fructose 1,6-bisphosphat Aldolase
144	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454784-455161	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463921-464298	
145	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464266	
146	<i>HYP2</i>	V	85621-86378	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
147	<i>TIF1</i>	XI	555163-556048	Translations Initiations Faktor eIF-4A
	<i>TIF2</i>	X	153436-154154	
148	<i>EGD2</i>	VIII	487644-488261	α -Untereinheit des NAC
149	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488275	α -Untereinheit des NAC
150	<i>HYP2</i>	V	85621-86243	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
151	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
152	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464266	
153	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-455459	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464596	
154	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
155	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454820-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463957-464266	
156	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
157	-	-	-	-
158	-	-	-	-
159	<i>EGD2</i>	VIII	487640-488275	α -Untereinheit des NAC
160	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
161	<i>PMP1</i>	III	162410-163224	regulatorische Untereinheit ATPase Pma1
162	<i>RPL31A</i>	IV	322206-322323	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL31B</i>	IV	322680-323068	
163	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-455177	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464314	
164	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454813-454927	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463950-464064	
165	<i>HYP2</i>	V	85621-86361	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524879-525407	
166	<i>HYP2</i>	V	85621-86388	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
167	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
168	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455074	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464211	
169	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488283	α -Untereinheit des NAC
170	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488250	α -Untereinheit des NAC
171	<i>EGD2</i>	VIII	487642-488261	α -Untereinheit des NAC
172	<i>TDH3</i>	VII	882911-883854	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
173	<i>EGD2</i>	VIII	487639-488275	α -Untereinheit des NAC
174	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488281	α -Untereinheit des NAC
175	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488268	α -Untereinheit des NAC
176	<i>EGD2</i>	VIII	487637-488275	α -Untereinheit des NAC
177	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488283	α -Untereinheit des NAC
178	<i>CDC19</i>	I	72657-73446	Pyruvat Kinase
179	<i>EGD2</i>	VIII	487639-488275	α -Untereinheit des NAC
180	<i>EGD2</i>	VIII	487644-488274	α -Untereinheit des NAC
181	<i>HOR2</i>	V	279766-280746	DL-glycerol-3-phosphatase
182	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488289	α -Untereinheit des NAC
183	<i>VTC1</i>	V	302775-303339	Vakuoläres Transporter Chaperone
184	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488283	α -Untereinheit des NAC
185	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
186	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC
187	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488274	α -Untereinheit des NAC

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
188	<i>TIF11</i>	XIII	789243-789855	Translations Initiations Faktor eIF-1A
189	<i>RPS6A</i>	XVI	377218-377994	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS6B</i>	II	591627-592420	
190	<i>HSC82</i>	XIII	632319-633092	Chaperon der Hsp90 Familie
191	<i>EGD2</i>	VIII	487648-488274	α -Untereinheit des NAC
192	<i>CDC19</i>	I	71757-72694	Pyruvat Kinase
193	<i>EGD2</i>	VIII	487647-488268	α -Untereinheit des NAC
194	<i>EGD2</i>	VIII	487643-488250	α -Untereinheit des NAC
195	<i>HYP2</i>	V	85621-86297	Translations Initiations Faktor eIF-5A
	<i>ANB1</i>	X	524871-525407	
196	-	-	-	-
197	-	-	-	-
198	-	-	-	-
199	<i>EGD2</i>	VIII	487649-488275	α -Untereinheit des NAC
200	-	-	-	-
201	-	-	-	-
202	-	-	-	-
203	-	-	-	-

4.1.3 Untersuchung des Cvt-Phänotyps im *egd2Δ*-Stamm

Die Identifizierung von Egd2 als potentieller Bindungspartner für Atg21 in 47% der Klone, ist ein starkes Indiz für eine Funktion in der Autophagie und bzw. oder im Cvt-Weg. Zunächst wurden Zellen des Wildtyps WCG4a sowie der Deletionsstämme *pep4Δ*, *atg21Δ* und *egd2Δ* für 4h in SD-N gehungert und Proteinextrakte mittels alkalischer Lyse hergestellt. Diese wurden durch SDS-PAGE separiert und anschließend die Reifung von proApe1 im Immunoblot mit einem Antikörper gegen Ape1 analysiert. In *pep4Δ*-Zellen ist die Reifung von proApe1 blockiert, in *atg21Δ*-Zellen ist die Reifung in wachsenden Zellen sowie in frühstationären Zellen blockiert (Cvt-Weg). Unter Hungereinfluss (Autophagie) dagegen wird proApe1 gereift. In Abbildung 4.3 ist zu sehen, dass in *egd2Δ*-Zellen proApe1 sowohl in gehungerten als auch ungehungerten Zellen normal gereift wird. Somit ist Egd2 nicht am Cvt-Weg beteiligt.

Die Lokalisation von Atg21 wurde durch ein Fusionsprotein aus Atg21 mit GFP (*green fluorescent protein*) gezeigt. Atg21-GFP lokalisiert an der vakuolären Membran, an definierte Punkte an der Vakuole (PAS) und teilweise am Endosom (Barth *et al.*, 2001; Krick *et al.*, 2008a; Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004).

Abbildung 4.3: Analyse der Ape1-Reifung im *egd2Δ*-Stamm.

Wachsende und für 4h in SD-N gehungerte Zellen der Stämme WCG4a (wt), *pep4Δ*, *atg21Δ*, und *egd2Δ* wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte im SDS-Gel separiert. Der Immunoblot mit Antiserum gegen Ape1 zeigt, dass der Cvt-Weg in *egd2Δ*-Zellen nicht gestört ist. **proApe1** (69 kDa); **mApe1** (57 kDa)

Um zu sehen, ob Atg21 in *egd2Δ*-Zellen misslokalisiert, wurde GFP-Atg21 in die Stämme *atg21Δ* und *egd2Δ* transformiert, als Negativkontrolle wurde der GFP-Vektor pUG36 ebenfalls in *egd2Δ* transformiert.

Frühstationäre und für 4h in SD-N gehungerte Zellen der transformierten Stämme wurden im Fluoreszenzmikroskop auf die Lokalisation von GFP-Atg21 in der Zelle hin untersucht. Wie in Abb. 4.4 zu sehen, ist GFP-Atg21 wie unter Wildtyp-Bedingungen lokalisiert, d.h. Egd2 hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von GFP-Atg21. Egd2 wurde in weiteren Experimenten zusätzlich analysiert. Diese sind im Abschnitt 4.4 aufgeführt.

Abbildung 4.4: Lokalisation von GFP-Atg21 in *atg21Δ*- und *egd2Δ*-Zellen.

Frühstationäre und für 4h in SD-N gehungerte Zellen der Stämme *atg21Δ* mit GFP-Atg21, *egd2Δ* mit GFP-Atg21 und *egd2Δ* mit pUG36 (GFP-Vektor) wurden im Fluoreszenzmikroskop auf die Lokalisation von GFP-Atg21 in der Zelle hin untersucht. Die Lokalisation von GFP-Atg21 in *egd2Δ*-Zellen zeigt den Wildtyp-Phänotyp.

4.2 Split-Ubiquitin Screen von Atg9

Atg9, ein Transmembranprotein der autophagischen Maschinerie, ist an der Biogenese von Autophagosomen und Cvt-Vesikeln beteiligt und wandert zwischen der PAS und einem peripheren Pool hin und her (Lang *et al.*, 2000; Noda *et al.*, 2000; Reggiori *et al.*, 2005b; Reggiori *et al.*, 2004). Der anterograde Transport von Atg9 zur PAS ist abhängig von den Proteinen Atg11, Atg23 und Atg27 sowie Aktin. Der retrograde Transport von der PAS zum peripheren Pool benötigt den Atg1-Atg13-Komplex, den Atg2-Atg18-Komplex sowie den PI3-Kinase-Komplex (Reggiori *et al.*, 2005a; Yen *et al.*, 2007).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Atg9 mit Atg2 interagiert (Wang *et al.*, 2001). Um zu klären ob Atg9 weitere funktionelle Interaktionspartner besitzt, wurde wie für Atg21 ein Split-Ubiquitin Screen mit einer cDNA-Genbank durchgeführt, die das gesamte Hefegenom abdeckt.

4.2.1 Herstellung des Köderplasmids pNCW-Atg9

Die Herstellung des für den Screen benötigten Köderplasmids erfolgte analog zur Herstellung des Plasmids für Atg21. Zuerst wurde das 2990 bp große DNA-Fragment von Atg9 durch PCR amplifiziert. Die Integration des PCR-Fragments in den *SacII*-linearisierten Vektor pNCW (N-terminale Fusion) erfolgte über homologe Rekombination. Der Vektor besitzt wie pCCW einen *CYC1*-Promotor, das Resistenzgen *KanR* sowie das Markergen *LEU2* und ein *CEN4/ARS1*-Element. In dem durch die homologe Rekombination entstandenen Plasmid pNCW-Atg9 ist *ATG9* N-terminal an die LexA-VP16-Cub Kassette gekoppelt.

Das Konstrukt wurde mittels Sequenzierung überprüft. Im Anschluss erfolgte die Transformation des Konstruktes in den Hefestamm NMY51. Zur Überprüfung der Expression des Fusionsproteins durch Nachweis des Reporterproteins LexA wurden stationäre Zellen der Stämme WCG4a (Negativkontrolle), *pep4Δ*, WCG4a mit einem LexA-Plasmid (Positivkontrolle) und vier Klone von *atg9Δ* transformiert mit pNCW-Atg9 durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte durch ein SDS-Gel separiert. Im folgenden Immunoblot mit Antiserum gegen LexA wurde die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen (Abbildung 4.5).

Abbildung 4.5: Überprüfung der Expression in LexA-Atg9 Fusionsproteins.

Stationäre Zellen der Stämme WCG4a (Negativkontrolle), *pep4Δ*, WCG4a mit einem LexA-Plasmid und vier Klone von *atg9Δ* transformiert mit pNCW-Atg9 wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte im SDS-Gel separiert. Der Immunoblot mit Antikörper gegen LexA zeigt die Expression des Atg9-LexA Fusionsproteins in den Klonen 1-3 des Stammes *atg9Δ* mit pNCW-Atg9. **Atg9-LexA** (153 kDa); **LexA** (38 kDa)

Zusätzlich wurden die mit pNCW-Atg9 transformierten Klone 1-4 von *atg9Δ* auf die Komplementation des *atg9Δ*-Phänotyps hin analysiert. Dazu wurden die gebundenen Antikörper von dem Immunoblot aus Abbildung 4.5 entfernt und im folgenden Immunoblot mit Antikörper gegen Ape1 die Reifung der proApe1 überprüft. Die Klone 1-4 des Konstruktes pNCW-Atg9 sind biologisch aktiv und zeigen im *atg9Δ*-Stamm den Wildtyp-Phänotyp (Abbildung 4.6).

Abbildung 4.6: Überprüfung der Ape1-Reifung in *atg9Δ* mit pNCW-Atg9.

Von dem Immunoblot aus Abbildung 4.5 wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Im darauf folgenden Immunoblot mit Antiserum gegen Ape1 zeigt die Komplementation des *atg9Δ*-Phänotyps der Klone 1-4 durch pNCW-Atg9. **proApe1** (69 kDa); **mApe1** (57 kDa)

Für den *Screen* mit Atg9 wurde Klon Nr.2 des Plasmids pNCW-Atg9 eingesetzt, da er das Fusionsprotein am stärksten exprimiert und Atg9 biologisch aktiv war.

Das Plasmid wurde daraufhin in den für den *Screen* verwendeten Stamm NMY51 transformiert.

Als zusätzliche Kontrolle für den *Screen* wurde (wie für pCCW-Atg21) das Kontrollplasmid pAI-Alg5 in den Stamm NMY51 pNCW-Atg9 transformiert. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pDL2-Alg5 ebenfalls in den Stamm NMY51 pNCW-Atg9 transformiert.

4.2.2 Co-Transformation von pNCW-Atg9 mit der Genbank NubGx

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von Atg9 wurde in den mit pNCW-Atg9 transformierten Stamm NMY51 zusätzlich die Genbank NubGx transformiert.

Im gesamten Ansatz wurden $3,51 \times 10^6$ Kolonien untersucht, von denen 108 Kolonien verteilt auf 38 Selektionsplatten wuchsen. Von allen Kolonien wurde Plasmid-DNA durch *Plasmid Rescue* aus den Hefezellen extrahiert und in *E. coli* transformiert. Nach der erneuten Extraktion der Plasmid-DNA aus *E. coli*, wurden die Plasmide in den Stamm NMY51, der bereits pNCW-Atg9 enthielt, transformiert. Nach Inkubation auf Selektionsplatten blieben 101 Kolonien übrig, die eine Interaktion mit einem unbekannten Protein zeigten. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden mittels Sequenzierung analysiert. 55 Klone konnten sequenziert und identifiziert werden.

33 Mal wurde *RDN25-1/RDN37-1*, zweimal *PGK1* und zweimal *RPS1A/B*. Jeweils einmal identifiziert wurden *BAP2*, *CCW12*, *ECM33*, *HHF1/2*, *RPL10*, *RPL15A/B*, *RPL21A/B*, *RPL36A/B*, *RPL41A*, *RPS4A/B*, *RPS7A/B*, *SSB1/2* sowie *YCR016W*, *YOL086W-A* und zwei genomische Abschnitte die keinen ORF beinhalten. Alle sequenzierten Klone sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Mit Ausnahme von *BAP2* (Leucin Permease), *CCW12* (Zellwandprotein), *ECM33* (keine Funktion bekannt; besitzt einen GPI-Anker), *HHF1/2* (Histon H4), *SSB1/2* (zytoplasmatische ATPase; gehört zur Familie der *HSP70* Chaperone) und *YCR016W* (mutmaßliches Protein; keine Funktion bekannt) codieren alle weiteren Gene für rRNAs oder Proteinuntereinheiten der Ribosomen.

Tabelle 4.2: Im Split-Ubiquitin Screen mit pNCW-Atg9 gefundene potentielle Interaktionspartner von Atg9.

Die mit „-“ bezeichneten Klone konnten nach dreimaligem Sequenzieren nicht identifiziert werden.

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
1	-	-	-	
2	<i>CCW12</i>	XII	369592-370142	Zellwand Mannoprotein
3	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	463929-464736	Untereinheit der 60S rRNA
6	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454837-455130	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463974-464267	
8	<i>SSB1</i>	IV	44046-45024	zytoplasmatische ATPase
	<i>SSB2</i>	XIV	252037-253018	
11	<i>RPS1A</i>	XII	1018138-1018926	ribosomales Protein 10 der 40S Untereinheit
	<i>RPS1B</i>	XIII	146434-147310	
12	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464266	
16	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464266	
17	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454815-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463952-464266	
18	kein ORF	IV	159193-159336	
19	-	-	-	
22	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-454989	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464126	
23	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454818-455162	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463955-464299	
24	kein ORF	IV	1239387-1239479	
25	-	-	-	
26	-	-	-	
27	-	-	-	
28	<i>RPL36A</i>	XIII	651608-651986	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL36B</i>	XVI	75699-75987	
29	-	-	-	
32	-	-	-	
33	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454779-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463916-464266	
34	<i>RPL21A</i>	II	606664-607162	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL21B</i>	XVI	406607-407643	
35	<i>HHF1</i>	II	255347-255711	Histon H4
	<i>HHF2</i>	XIV	576694-577213	
36	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454814-455558	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463951-464695	
38	-	-	-	
39	<i>RPL15A</i>	XII	201849-202614	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
	<i>RPL15B</i>	XIII	509678-510351	
42	-	-	-	

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
43	-	-	-	
44	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454820-455142	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463957-464279	
45	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454825-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463962-464266	
47	<i>RPS1A</i>	XII	1018081-1018933	ribosomales Protein 10 der 40S Untereinheit
	<i>RPS1B</i>	XIII	146449-147302	
48	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464266	
49	<i>RPS7A</i>	XV	506245-506851	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS7B</i>	XIV	443328-443830	
50	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464266	
51	<i>ECM33</i>	II	393497-394203	Protein ohne bekannte Funktion
56	-	-	-	
57	<i>PGK1</i>	III	137704-138686	3-Phosphoglyceratkinase
59	-	-	-	
60	-	-	-	
61	-	-	-	
63	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454789-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463926-464266	
64	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454779-455162	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463916-464299	
65	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464266	
66	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455162	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464299	
67	-	-	-	
71	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464266	
72	-	-	-	
73	<i>RPL10</i>	XII	282903-283711	ribosomales Protein der 60S Untereinheit
74	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454789-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463926-464266	
75	<i>YCR016W</i>	III	143607-143891	putatives Protein ohne bekannte Funktion
76	<i>RPS4A</i>	X	701904-702792	ribosomales Protein der 40S Untereinheit
	<i>RPS4B</i>	VIII	504352-505291	
77	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454810-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463947-464266	
78	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454824-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463961-464266	
79	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464266	
80	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454813-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463950-464266	

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
81	-	-	-	
82	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454812-455130	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463949-464267	
83	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454805-455213	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463942-464350	
84	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454800-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463937-464266	
85	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454813-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463950-464266	
86	<i>BAP2</i>	II	374941-375749	Leucin Permease
89	<i>PGK1</i>	III	137701-138655	3-Phosphoglyceratkinase
90	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454820-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463957-464266	
91	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463964-464368	Untereinheit der 60S rRNA
92	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454805-455262	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463942-464399	
93	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454815-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463952-464266	
94	-	-	-	
95	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454814-455129	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463951-464266	
96	<i>RPL41A</i>	IV	130199-130507	ribosomales Protein L47 60S Untereinheit
97	<i>YOL086W-A</i>	XV	159350-159547	
100	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454819-455275	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463956-464412	
101	<i>RDN25-1/RDN37-1</i>	XII	454829-455162	Untereinheit der 60S rRNA
	<i>RDN25-2/RDN37-2</i>	XII	463966-464299	

4.3 Die Bedeutung des FRRG-Bindemotivs in den homologen Proteinen Atg18 und Atg21

Atg18 und Atg21 sind an der PAS und an der Vakuolenmembran lokalisiert (Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004) und binden beide über das konservierte FRRG-Motiv sowohl an PI3P (Endosom und PAS) als auch an PI(3,5)P₂ (Vakuole) (Dove *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2008a; Stromhaug *et al.*, 2004). Mutation des Motivs von FRRG zu FTTG in Atg18 führt zum Verlust der Bindung an PI3P und PI(3,5)P₂. In Atg21 führt die Mutation von FRRG zu FTTG zu einer Reduktion der PIP-Bindung zu binden (Dove *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2006; Stromhaug *et al.*, 2004).

Wie sich die Mutation von FRRG zu FTTG in den Proteinen Atg18 und Atg21 auf deren Lokalisation in der Zelle auswirkt konnte nur für Atg18^{FTTG}-GFP gezeigt werden (Dove *et al.*, 2004). Zellen der Stämme *atg18Δ* transformiert mit GFP-Atg18, *atg18Δ* transformiert mit GFP-Atg18^{FTTG}, *atg21Δ* transformiert mit Atg21-GFP und *atg21Δ* transformiert mit Atg21^{FTTG}-GFP wurden in Selektionsmedium (Cvt-Weg) inkubiert oder für 4h in SD-N zur Induktion von Autophagie gehungert.

Abbildung 4.7: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Lokalisation von GFP-Atg18^{FTTG} und Atg21^{FTTG}-GFP.

Für 4h in SD-N gehungerte und ungehungerte Zellen der Stämme *atg18Δ* mit GFP-Atg18, *atg18Δ* mit GFP-Atg18^{FTTG}, *atg21Δ* mit Atg21-GFP und *atg21Δ* mit Atg21^{FTTG}-GFP wurden im Fluoreszenzmikroskop auf Lokalisation der Fusionsproteine hin überprüft.

A GFP-Atg18^{FTTG} lokalisiert diffus im Zytosol und verstärkt im Nukleus unter beiden Kulturbedingungen. B Atg21^{FTTG}-GFP lokalisiert diffus im Zytosol in gehungerten und nicht gehungerten Zellen. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Aus Krick *et al.*, 2006.

Anschließend wurde im Fluoreszenzmikroskop die Lokalisation der Fusionsproteine analysiert. In Abbildung 4.7A ist zu sehen, dass GFP-Atg18^{FTTG} unter beiden Kulturbedingungen diffus im Zytosol und verstärkt im Nukleus lokalisiert ist. Atg21^{FTTG}-GFP (Abbildung 4.7B) ist wie GFP-Atg18^{FTTG} im Zytosol, aber nicht im Nukleus lokalisiert. Sowohl Atg21^{FTTG}-GFP als auch GFP-Atg18^{FTTG} zeigen keine Lokalisation an perivakuolären Punkten oder der Vakuolenmembran wie die entsprechenden Wildtypproteine. Das FRRG Motiv ist daher notwendig für die korrekte Lokalisation in beiden Proteinen.

4.4 Bedeutung der drei homologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c für die Vakuolenfragmentierung und –vererbung

Bei der Teilung von Hefezellen werden Teile der Vakuole von den Mutter- auf die Tochterzellen übertragen. Dies wird als Vakuolenvererbung bezeichnet. Die Vakuole der Hefezelle ist nicht nur das lytische Kompartiment der Zelle, sondern auch wichtig für die Adaption der Zelle an die wechselnden osmotischen Bedingungen der Umgebung. Bei hyperosmotischem Schock reagiert die Hefe mit Vakuolenfragmentierung, d.h. der Aufteilung der Vakuole in mehrere kleine Vakuolen (Übersicht siehe Hohmann *et al.*, 2007; Weisman, 2006).

Atg18 und Atg21 sind an perivakuolären Punkten und an der Vakuolenmembran lokalisiert (Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004) und binden beide über das konservierte FRRG-Motiv sowohl an PI3P (PAS) als auch an PI(3,5)P₂ (Vakuole) (Dove *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004). PI(3,5)P₂ wird durch die Kinase Fab1 aus PI3P gebildet. Die Deletion von *FAB1* führt zu einer unnatürlich großen Vakuole sowie einem Defekt in der Vakuolenvererbung (Yamamoto *et al.*, 1995). In *atg18Δ*-Zellen ist die Vakuole, analog zu *fab1Δ*-Zellen, ebenfalls unnatürlich groß (Dove *et al.*, 2004). Ob Atg18 eventuell auch eine wichtige Rolle bei der Vakuolenvererbung oder Vakuolenfragmentierung spielen könnte, war bisher nicht bekannt. Daher sollte fluoreszenzmikroskopisch (siehe 3.2.4.1) untersucht werden, ob Atg18 und seine homologen Proteine Atg21 und Ygr223c sowie Egd2 (siehe 4.1.2) die Vererbung oder Fragmentierung der Vakuole beeinflussen könnten.

4.4.1 Vakuolenfragmentierung

Die Vakuolenmembran von wachsenden Zellen der Stämme BY4741, *fab1Δ*, *atg18Δ*, *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ* wurden zunächst für mit FM4-64 (Färbung von Lipiden der Vakuolenmembran) gefärbt (siehe 3.2.4.1). 1ml der Kultur wurde für eine weitere Stunde in Wachstumsmedium inkubiert. Parallel dazu wurde 1ml der Zellkultur durch Inkubation in Medium mit 0,4M NaCl für eine Stunde starkem hyperosmotischem Stress ausgesetzt.

Abbildung 4.8: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Fähigkeit verschiedener Mutanten zur Vakuolenfragmentierung.

Die Vakuolenmembran wachsender Zellen der Stämme BY4741, *fab1Δ*, *atg18Δ*, *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ* wurden mit FM4-64 gefärbt. 1ml der Zellen wurde für eine Stunde in YPD geschüttelt. Parallel dazu wurde 1ml der Kultur für eine Stunde in YPD+0,4M NaCl inkubiert. Danach wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, ob die Zellen der einzelnen Stämme zur Vakuolenfragmentierung fähig waren. Es wurden jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Im Anschluss daran wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, ob die Zellen der einzelnen Stämme fähig waren, durch Vakuolenfragmentierung auf die veränderten osmotischen Bedingungen zu reagieren. Dazu wurde die Morphologie der Vakuole in jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung ausgewertet (Abbildung 4.8).

Unter Wachstumsbedingungen ohne osmotischen Stress sind in Zellen des Wildtypstamms BY4741 31,0% der Vakuolen fragmentiert. Unter hyperosmotischen Bedingungen ist die Zahl auf 55,1% erhöht. In *Fab1Δ*-Zellen erfolgt unter beiden Bedingungen keine Fragmentierung der Vakuole. In *atg18Δ*-Zellen ist die Fragmentierung stark reduziert. Ohne osmotischen Stress

sind nur 2,6%, unter Stress 11,1% der Vakuolen fragmentiert. Auch *atg21Δ*-Zellen zeigen mit 14,1% unter normoosmolaren Bedingungen und 33,2% unter osmotischen Stress eine Reduktion der Vakuolenfragmentierung. Zellen des *ygr223cΔ*-Stammes verhalten sich mit 29,4% fragmentierter Vakuolen ohne und 52,0% mit osmotischem Stress wie der Wildtyp. Die Zellen des *egd2Δ*-Stammes hingegen haben häufiger fragmentierte Vakuolen als der Wildtyp. Unter normalen Bedingungen sind 48,0% und unter Stress 81,3% der Vakuolen fragmentiert. Wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist die Fragmentierung auch stärker ausgeprägt und die Anzahl der kleinen Vakuolen erhöht. In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Auszählung zusammengefasst und in Abbildung 4.9 graphisch dargestellt.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Vakuolenfragmentierung in verschiedenen Deletionsmutanten.

Dargestellt sind die absoluten und prozentualen Werte der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Vakuolenfragmentierung in Zellen der Stämme BY4741, *fab1Δ*, *atg18Δ*, *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ*. Es wurden jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Stamm	Fragmentiert:			Fragmentiert:		
	60 min YPD			60 min YPD + 0,4M NaCl		
	nein	ja	in %	nein	ja	in %
BY4741	307	138	31,0	245	301	55,1
<i>fab1Δ</i>	376	0	0,0	488	0	0,0
<i>atg18Δ</i>	419	11	2,6	511	64	11,1
<i>atg21Δ</i>	372	61	14,1	298	148	33,2
<i>ygr223cΔ</i>	278	116	29,4	214	232	52,0
<i>egd2Δ</i>	229	211	48,0	79	343	81,3

Abbildung 4.9: Quantifizierung der Vakuolenfragmentierung in verschiedenen Mutanten.

Grundlage für die Graphische Darstellung sind die in Abbildung 4.8 und Tabelle 4.3 dargelegten Ergebnisse.

4.4.2 Vakuolenvererbung

Die Vakuolen von wachsenden Zellen der Stämme BY4741, *vac1Δ*, *fab1Δ*, *atg18Δ*, *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ* wurden mit FM4-64 gefärbt. Im Anschluss wurde im Fluoreszenzmikroskop bestimmt, wie viele Zellen der einzelnen Stämme Teile ihrer Vakuole auf Tochterzellen übertragen haben (siehe Abbildung 4.10). Für die Auswertung wurden jeweils mindestens 120 sich teilende Zellen pro Stamm ausgewertet.

Zellen des Wildtypstamms BY4741 zeigten in 87,4% der Fälle eine Vererbung. *Vac1Δ*- und *fab1Δ*-Zellen sind nicht zur Vererbung fähig. Zellen der Stämme *atg18Δ* und *atg21Δ* sind im Vergleich zum Wildtyp mit 65,8% und 66,7% Vererbung in ihrer Fähigkeit zur Vakuolenvererbung beeinträchtigt. Der *ygr223cΔ*-Stamm zeigt mit 77,8% eine geringe Reduktion. Dies gilt mit 69,0% auch für *egd2Δ*. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst und in der Abbildung 4.11 zusätzlich graphisch dargestellt.

Abbildung 4.10: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Fähigkeit von Hefezellen zur Vakuolenvererbung.

Vakuolen von wachsenden Zellen der Stämme BY4741, *vac1Δ*, *fab1Δ*, *atg18Δ*, *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ* wurden mit FM4-64 gefärbt. Die gewaschenen Zellen wurden für eine Stunde inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, ob die Zellen der einzelnen Stämme zur Vakuolenvererbung fähig waren. Es wurden jeweils mindestens 120 Zellen pro Stamm aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Vakuolenvererbung in verschiedenen Deletionsmutanten.

Dargestellt sind die absoluten und prozentualen Werte der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Vakuolenvererbung in Zellen der Stämme BY4741, *vac1Δ*, *fab1Δ*, *atg18Δ*, *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ*. Es wurden jeweils mindestens 120 Zellen pro Stamm und Bedingung aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet. *Die Vererbungsrate des Wildtyps auf 100% gesetzt.

Stamm	Anzahl Knospen	Vererbung	in %	relativ in %*
BY4741	238	208	87,4	100
<i>vac1Δ</i>	192	0	0	0
<i>fab1Δ</i>	124	0	0	0
<i>atg18Δ</i>	234	154	65,8	75,3
<i>atg21Δ</i>	219	146	66,7	76,3
<i>ygr223cΔ</i>	180	140	77,8	89,0
<i>egd2Δ</i>	216	149	69	78,9

Abbildung 4.11: Quantifizierung der Vakuolenvererbung in verschiedenen Deletionsmutanten.

Grundlage für die Graphische Darstellung sind die in Abbildung 4.9 und Tabelle 4.4 dargelegten Ergebnisse. Es wurden jeweils mindestens 120 Zellen pro Stamm und Bedingung ausgewertet.

4.4.3 Die Bedeutung des FRRG-Motivs in Atg18 bei der Vakuolenfragmentierung

Die Mutation des FRRG-Motivs zu FTTG in Atg18 führt zum Verlust der Fähigkeit PI3P und PI(3,5)P₂ zu binden. Atg18^{FTTG} zeigt Defekte während des Cvt-Wegs, beim retrograden Transport von der Vakuole zum späten Endosom und führt zur Freisetzung des mutierten Proteins von der vakuolären Membran in das Zytosol (Dove *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2006; Stromhaug *et al.*, 2004).

Atg18 und Atg21 binden die gleichen Lipide über das FRRG-Motiv. Atg21 spielt allerdings keine Rolle beim retrograden Transport. Zudem sind beide Proteine unterschiedlich an der Organisation der PAS beteiligt.

Die Mutation von FRRG zu FTTG in Atg21 führt zu einem partiellen Verlust PIP-Bindung. Jedoch verliert Atg21^{FTTG}-GFP wie GFP-Atg18^{FTTG} seine Bindung an die Vakuole und lokalisiert diffus im Zytosol wenn der Cvt-Weg und auch Autophagie aktiv sind (Krick *et al.*, 2006).

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, inwiefern das FRRG-Motiv in Atg18 für die Vakuolenfragmentierung wichtig ist. Dazu wurde *atg18Δ* mit den

Plasmiden pRS315-Atg18-HA (Positivkontrolle), pRS315-Atg18^{FTTG}-HA und pRS315 (Negativkontrolle) transformiert. Wachsende Zellen der Stämme *atg18Δ* transformiert mit Atg18-HA, *atg18Δ* mit Atg18^{FTTG}-HA und *atg18Δ* mit pRS315 wurden zunächst mit FM4-64 gefärbt. 1ml der Kultur wurde für eine weitere Stunde in Wachstumsmedium geschüttelt. Parallel dazu wurde 1ml der Zellkultur durch Inkubation in Medium mit 0,4M NaCl für eine Stunde starkem hyperosmotischem Stress ausgesetzt.

Im Anschluss wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, ob die Zellen der einzelnen Stämme zur Vakuolenfragmentierung fähig waren. Dazu wurde die Morphologie der Vakuole in jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung analysiert (siehe Abbildung 4.12).

Abbildung 4.12: Einfluss des konservierten FRRG-Motivs von Atg18 auf die Vakuolenfragmentierung.

Vakuolen von wachsenden Zellen der Stämme *atg18Δ* transformiert mit Atg18-HA, *atg18Δ* mit Atg18^{FTTG}-HA und *atg18Δ* mit pRS315 wurden zunächst mit FM4-64 gefärbt. Anschließend wurden parallel 1ml der Zellen eine Stunde in YPD und 1ml in YPD+0,4M NaCl inkubiert. Danach wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, ob die Zellen der einzelnen Stämme zur Vakuolenfragmentierung fähig waren. Es wurden jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Unter Wachstumsbedingungen sind in Zellen des Stammes *atg18Δ* transformiert mit Atg18-HA 42,6% der Vakuolen fragmentiert. Unter hyperosmotischen Bedingungen sind es 53,4%. In der Negativkontrolle *atg18Δ* mit pRS315 sind ohne Stress 1,2% und mit Stress 5,6% der Vakuolen fragmentiert. Im Stamm *atg18Δ* mit Atg18^{FTTG}-HA sind dagegen 5,2% der Vakuolen ohne osmotischen Stress und 12,8% mit osmotischen Stress fragmentiert. Ergebnisse der Auszählung sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst und in Abbildung 4.13 graphisch dargestellt.

Zellen des Stammes *atg18Δ* transformiert mit Atg18^{FTTG}-HA zeigen somit denselben Phänotyp wie Zellen der Negativkontrolle *atg18Δ* mit pRS315 im selben Experiment und Zellen des Stammes *atg18Δ* (siehe 4.8). Das FRRG-Motiv in Atg18 spielt daher eine Rolle bei der Vakuolenfragmentierung.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Vakuolenfragmentierung in verschiedenen Mutanten.

Gezeigt sind die absoluten und prozentualen Werte der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Vakuolenfragmentierung in Zellen der Stämme *atg18Δ* transformiert mit Atg18-HA, *atg18Δ* mit Atg18^{FTTG}-HA und *atg18Δ* mit pRS315. Es wurden jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

Stamm	Fragmentiert:			Fragmentiert:		
	60 min YPD			60 min YPD + 0,4M NaCl		
	nein	ja	in %	nein	ja	in %
<i>atg18Δ</i> mit Atg18-HA	269	200	42,6	207	237	53,4
<i>atg18Δ</i> mit Atg18 ^{FTTG} -HA	434	24	5,2	422	62	12,8
<i>atg18Δ</i> mit pRS315	426	5	1,2	423	25	5,6

Abbildung 4.13: Quantifizierung der Vakuolenfragmentierung in den Stämmen *atg18Δ* transformiert mit Atg18-HA, *atg18Δ* mit Atg18^{FTTG}-HA und *atg18Δ* mit pRS315.

Grundlage für die Graphische Darstellung sind die in Abbildung 4.11 und Tabelle 4.5 aufgeführten Ergebnisse. Es wurden jeweils mindestens 400 Zellen pro Stamm und Bedingung ausgewertet.

4.5 Überexpression von GFP-YGR223C führt zur Sekretion von Carboxypeptidase Y (CPY)

Die vakuoläre Hydrolase Carboxypeptidase Y (auch Proteinase C) wird als inaktive Proform synthetisiert, im ER Lumen nach Spaltung seiner N-terminalen Signalsequenz N-glykosiliert und phosphoryliert (Hashimoto *et al.*, 1981; Hasilik und Tanner, 1978). Nach dem Transport zum Golgi-Apparat und der Addition weiterer Oligosaccharide, verlässt die sogenannte p2-CPY-Form das Prevakuoläre Kompartiment (*prevacuolar compartment* = PVC) und wird durch Bindung an seinen Rezeptor Vps10 mittels eines vakuolären Lokalisierungssignals im N-terminalen Teil des Propeptids zur Vakuole transportiert (Deloche *et al.*, 2001; Valls *et al.*, 1990). In der Vakuole wird sie dann durch Proteinase A gereift (Sorensen *et al.*, 1994).

Untersuchungen zur möglichen Funktion der drei Homologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c in verschiedenen Transportwegen der Zellen wurden durch Dr. R. Krick durchgeführt.

Dazu wurden sowohl Einfach-, Doppel- und Dreifach-Deletionen der Gene als auch Überexpressions-Plasmide hergestellt und unter verschiedenen Bedingungen getestet. Es zeigte sich, dass nur die Überexpression von GFP-YGR223C zur Sekretion von CPY führte.

Zur Verifizierung dieser Entdeckung wurden der Wildtypstamm WCG4a mit verschiedenen Überexpressionsplasmiden und *vps28Δ* mit dem Leervektor pUG36 transformiert. Dadurch wurden folgende Stämme erhalten:

WCG4a mit dem Leervektor (Negativkontrolle), WCG4a mit GFP-Atg18, WCG4a mit GFP-Atg21, WCG4a mit GFP-Ygr223c und *vps28Δ* mit pUG36 als Positivkontrolle. Vps28 ist eine Komponente des ESCRT-I Komplexes. Die Deletion von *VPS28* führt zur Sekretion von CPY (Robinson *et al.*, 1988).

Mit Zellen dieser Stämme wurde ein CPY-*Overlay-Assay* durchgeführt (siehe 3.2.3.11). Im Immunoblot mit Antikörper gegen CPY ist zu sehen, dass die Positivkontrolle CPY stark sekretiert. WCG4a mit pUG36, GFP-Atg18 und mit GFP-Atg21 zeigen nur ein sehr geringes Signal. WCG4a mit GFP-Ygr223c zeigt eine signifikante, aber im Vergleich zur Positivkontrolle *vps28Δ* mit pUG36 eine geringere Sekretion von CPY (Abbildung 4.14).

Abbildung 4.14: Sekretion von CPY bei Überexpression von GFP-Ygr223c.

Mit Zellen der Stämme WCG4a mit pUG36 (Negativkontrolle), WCG4a mit GFP-Atg18, WCG4a mit GFP-Atg21, WCG4a mit GFP-Ygr223c und *vps28Δ* mit pUG36 (Positivkontrolle) wurde ein CPY-*Overlay-Assay* durchgeführt. Im Immunoblot mit Antikörper gegen CPY ist zu sehen, dass die Positivkontrolle CPY stark sekretiert. WCG4a mit pUG36, mit GFP-Atg18 und mit GFP-Atg21 zeigen nur ein sehr geringes Signal. WCG4a mit GFP-Ygr223c zeigt eine signifikante, aber im Vergleich zur Positivkontrolle *vps28Δ* mit pUG36 eine geringere Sekretion von CPY.

4.5.1 Co-Transformation von WCG4a mit GFP-Ygr223c mit der Genbank AB320

Als nächstes stellte sich die Frage warum CPY sekretiert wird, wenn GFP-YGR223C in der Zelle überexprimiert ist. Dies führte zu der Überlegung, dass Ygr223c möglicherweise mit einem Protein (oder mehreren), welches für den funktionellen sekretorischen Transportweg wichtig ist, interagiert. Die Überexpression von Ygr223c könnte dazu führen, dass eine Komponente des CPY-Transportweges durch Interaktion mit überschüssigem Ygr223c blockiert wird und ihre Funktion nicht mehr ausführen kann und dadurch der sekretorische Weg gestört wird. Würde dieser hypothetische Bindungspartner überexprimiert werden, und dadurch in einer ähnlichen Anzahl an Molekülen vorliegen wie Ygr223c, könnte dies den Defekt aufheben. Diese Überlegung lieferte einen neuen Ansatz zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern. Dazu wurde in den Stamm WCG4a mit GFP-Ygr223C zusätzlich die Genbank AB320 (ATCC Nummer 37323) transformiert. Diese Genbank enthält 5-20 kB lange DNA-Fragmente, die in den Überexpressionsvektor YEp13 integriert sind und in etwa 10000 Klonen das ganze Hefe-Genom abdecken (Nasmyth und Reed, 1980b). Die Negativ- und Positivkontrolle WCG4a mit pUG36, respektive *vps28Δ* mit pUG36, wurden zusätzlich mit dem leeren Vektor pRS315 transformiert, damit beide Stämme die gleichen Selektionsbedingungen hatten wie WCG4a mit GFP-Ygr223c und YEp13.

Im gesamten Ansatz wuchsen 20721 Kolonien verteilt auf 60 Platten. Von diesen Platten wurden Replika angefertigt. Anschließend wurde mit einem Zahnstocher an fünf verschiedenen Punkten eine geringe Menge Zellmaterial des Stammes WCG4a mit pUG36 und pRS315 (Negativkontrolle) und an einem Punkt Material des Stammes *vps28Δ* mit pUG36 und pRS315 (Positivkontrolle) auf jede Platte aufgebracht. Im Immunoblot mit Antikörper gegen CPY ist zu sehen, dass der Referenzstamm und die meisten Kolonien CPY sekretieren.

In Abbildung 4.15 ist exemplarisch eine Originalplatte des *Screens* vor dem Replika-plattieren mit dem korrespondierenden Immunoblot gezeigt. Pfeile markieren die Kolonien, die wenig bzw. keine CPY-Sekretion aufzeigen. Die Referenzpunkte sind mit einem Kreis markiert.

Von Kolonien die keine CPY-Sekretion gezeigt haben, wurde ein Teil der Zellmasse auf eine Selektionsplatte im *Patch* ausgestrichen. Zusätzlich wurden die Stämme WCG4a mit pUG36 und pRS315 (Negativkontrolle) und *vps28Δ* mit pUG36 und pRS315 (Positivkontrolle) ausgestrichen. Im Immunoblot mit Antikörper gegen CPY wurde dann überprüft, welche der Stämme weiterhin CPY sekretieren, diese Stämme wurden erneut ausgestrichen. In zwei weiteren unabhängigen Versuchen wurde im Immunoblot mit Antikörper gegen CPY die fehlende CPY-Sekretion überprüft (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 4.15: Sekretion von CPY bei Überexpression von GFP-YGR223C.

In den Stamm *ygr223cΔ* mit GFP-Ygr223c wurde zusätzlich die Genbank AB320 transformiert. Im gesamten Ansatz wuchsen 20721 Kolonien verteilt auf 60 Platten. Nach der Replika-Plattierung wurde mit einem Zahnstocher an fünf verschiedenen Punkten Zellmaterial des Stammes WCG4a mit pUG36 und pRS315 (Negativkontrolle) und an einem Punkt Material des Stammes *vps28Δ* mit pUG36 und pRS315 (Positivkontrolle) auf jede Platte gegeben, eine Nitrocellulose-Membran auf die Zellen gelegt und die Platte bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert. Exemplarisch dargestellt ist eine Originalplatte (rechts) des Screens vor dem Replika-plattieren mit dem korrespondierenden Immunoblot (links). Pfeile markieren die Kolonien die geringe bzw. keine CPY-Sekretion aufzeigen. Die Referenzpunkte sind mit einem Kreis markiert.

Von den Stämmen die weiterhin keine CPY sekretierten wurde Plasmid-DNA durch *Plasmid Rescue* (siehe 3.2.2.2.1) aus den Hefezellen extrahiert und in *E. coli* transformiert. Nach der erneuten Extraktion der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden die Plasmide durch Sequenzanalyse näher bestimmt. Dafür wurden die erhaltenen Sequenzen durch BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Analyse

in der SGD Datenbank Genomabschnitten zugeordnet (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>). Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Im Screen gefundene potentielle Interaktionspartner von GFP-Ygr223c.

Klon	ORF	Chromosom	Sequenz- bereich (Bp)	Funktion
1	<i>SRB8</i>	III	258334-258862	RNA Polymerase II Mediator
2	<i>SRB8</i>	III	258482-258863	RNA Polymerase II Mediator
3	<i>CDC45</i>	XII	344798-345279	DNA-Replikation Initiationsfaktor Translations-Initiationsfaktor
4	<i>GCD2</i>	VII	645082-645517	eIF2B
5	<i>AIM21</i>	IX	362143-362512	unbekannt
6	<i>OTU2</i>	VIII	78316-78917	unbekannt

Insgesamt wurden in dem Screen fünf unterschiedliche potentielle Interaktionspartner für GFP-Ygr223c gefunden. *SRB8* codiert für eine Untereinheit des RNA Polymerase II Mediator Komplex. Cdc45 ist ein DNA-Replikation Initiationsfaktor, Gcd2 ist dagegen die Delta-Untereinheit des Translations-Initiationsfaktor eIF2B. Aim21 und Otu2 sind Proteine mit unbekannter Funktion.

4.6 Die Suche nach neuen Bindungspartnern für Trs85

Obwohl ursprünglich als *GSG1* (*general sporulation gene 1*) identifiziert (Kaytor und Livingston, 1995), ist Trs85 eine nicht-essentielle Untereinheit der TRAPP (*transport protein particle*)-Komplexe. TRAPP I (Bet5, Bet3, Trs20, Trs23, Trs31, Trs33 und Trs85) und TRAPP II (TRAPP I-Komponenten und Trs65, Trs120 sowie Trs130) wurden von M. Sacher und Kollegen isoliert (Sacher *et al.*, 2001).

Für *trs85Δ*-Zellen konnte gezeigt werden, dass proApe1 über den Cvt-Weg nicht gereift wird und über Autophagie nur mit 50% der Effizienz des Wildtyps (Meiling-Wesse *et al.*, 2005). Somit scheint Trs85 eine spezifische Funktion im Cvt-Weg zu besitzen. Mit welchen zusätzlichen Proteinen Trs85 für diesen Weg

interagiert ist nicht bekannt. Weitere Interaktionspartner für Trs85 sollten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der TAP-Tag (*tandem affinity purification*)-Methode identifiziert werden. Der Tag besteht aus der Proteinsequenz für zwei IgG-Bindungsstellen des Protein A und einem Calmodulinbindenden Peptid (CBP), die durch eine Spaltstelle der TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Protease voneinander getrennt sind (Puig *et al.*, 2001). Chromosomal integrierte TAP-Fusionsproteine sind für fast alle Hefeproteine kommerziell erhältlich.

Zur Etablierung der Methode wurde zunächst das Fusionsprotein Bet3-TAP verwendet, da Bet3 bereits erfolgreich in den Studien von Sacher (Sacher *et al.*, 2001) für die Isolation der TRAPP-Komplexe eingesetzt wurde.

Bet3-TAP wurde nach dem in Abschnitt 3.2.3.7 erklärten Verfahren aus Hefezellen isoliert, über zwei Säulen gereinigt und die Proteine durch eine SDS-PAGE separiert. Nach Färbung mit colloidalem Coomassie wurde das Gel für die massenspektroskopische Identifizierung der einzelnen Proteinbanden verwendet. Dazu folgte ein In-Gel-Verdau (IGV) der Proteinbanden mit Trypsin. Die erhaltenen Peptide wurden durch MALDI-TOF-Analysen identifiziert (siehe 3.2.3.8).

Abbildung 4.16: Coomassie-gefärbtes Gel des TRAPP-Komplexes.

Zellen des Stammes S288C Bet3-TAP wurden bei einer OD₆₀₀ von 2 geerntet und nach dem TAP-Protokoll (siehe 3.2.3.7) aufgeschlossen, der an Bet3-TAP gebundene Komplex aufgereinigt und in einem 4-15%-SDS-Gel separiert. Die einzelnen Proteinbanden wurden in einem In-Gel-Verdau mit Trypsin in Peptide aufgespalten und diese durch MALDI-TOF Massenspektroskopie analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch BLASTP-Suche mit Hilfe der MASCOT Datenbank (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

Um die jeweils gefundenen Peptide bekannten Proteinen zuzuordnen wurde die MASCOT Datenbank (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) genutzt. Abbildung 4.16 zeigt den mit Bet3-TAP isolierten TRAPP-Komplex im Coomassie-gefärbten Gel. In diesem Versuch konnten neun der zehn bekannten Komponenten des TRAPP II-Komplexes identifiziert werden: Trs120, Trs85, Trs65, Trs33, Trs31, Bet3, Trs23, Trs20 und Bet5. Zusätzlich wurden noch Tef1, Rpl4a, Tdh3 und Rps19A/B gefunden. Trs130 konnte in mehreren Versuchen nicht identifiziert werden.

Für die Aufreinigung mit Trs85-TAP wurden die gleichen Bedingungen und wie für Bet3-TAP gewählt. Abbildung 4.17 zeigt die mit Trs85-TAP isolierten Proteine im coomassie-gefärbten Gel. In diesem Versuch konnten Trs31 und Trs20 aus dem TRAPP II-Komplex identifiziert werden. Zusätzlich wurden noch Tef1 und Tdh3 gefunden, die auch im Versuch mit Bet3-TAP isoliert wurden.

Abbildung 4.17: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit Trs85 (1)

Zellen des Stammes S288C Trs85-TAP wurden bei einer OD₆₀₀ von 2 geerntet und nach dem TAP-Protokoll aufgeschlossen, der an Trs85-TAP gebundene Komplex aufgereinigt und in einem 4-15%-SDS-Gel separiert. Die einzelnen Proteinbanden wurden in einem In-Gel-Verdau mit Trypsin in Peptide aufgespalten und diese durch MALDI-TOF Massenspektroskopie analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch BLASTP-Suche mit Hilfe der MASCOT Datenbank (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

In einem weiteren Versuch mit Trs85-TAP (Abbildung 4.18) wurden weitere Proteine als vermutliche Interaktionspartner von Trs85 gefunden. Aus dem TRAPP-Komplex wurde Trs33, aber nicht Trs31 und Trs20 wie im vorherigen Versuch identifiziert (Abbildung 4.17). Tdh3 und Tef1 wurden erneut gefunden sowie Sse1, Ssa1/2 nebst Ssb1/2, Pdc1, Tdh2, Fin1, Rps5, Rps7 und Rpl26b.

Abbildung 4.18: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit Trs85 (2).

Zellen des Stammes S288C Trs85-TAP wurden bei einer OD₆₀₀ von 2 geerntet und nach dem TAP-Protokoll aufgeschlossen, der an Trs85-TAP gebundene Komplex aufgereinigt und in einem 4-15%-SDS-Gel separiert. Die einzelnen Proteinbanden wurden in einem In-Gel-Verdau mit Trypsin in Peptide aufgespalten und diese durch MALDI-TOF Massenspektroskopie analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch BLASTP-Suche mit Hilfe der MASCOT Datenbank (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

Sse1, Ssa1/2, Ssb1/2 (alle Mitglieder der HSP70 Chaperon Familie), sowie Rps5, Rps7 (beides Proteine der kleinen 40S ribosomalen Untereinheit), Rpl26b (Protein der 60S ribosomalen Untereinheit), sowie Pdc1 (Pyruvat Decarboxylase Isoenzym 1), Fin1 (Spindelpol Filamentprotein), Tdh2 (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) und Tef1 (Translations Elongations Faktor EF-1 alpha), sind mit großer Wahrscheinlichkeit unspezifisch aufgereinigte Proteine.

Weitere Proteine der TRAPP-Komplexe oder Proteine die auf eine Funktion beim Cvt-Weg bzw. bei der Autophagie deuten, konnten nicht identifiziert werden.

Für weitere Versuche mit Hilfe des TAP-Tags Interaktionspartner für Trs85 zu identifizieren, wurde auf die Reinigung mit Hilfe des Calmodulin Bindepeptids verzichtet. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass vermehrt Proteine unspezifisch eluiert werden, bietet aber den Vorteil nur kleinere Volumina Zellkultur zu

benötigen und weniger Gesamtprotein durch die zweite Aufreinigung zu verlieren. Zudem lassen sich dadurch in parallelen Ansätzen verschiedene Extrakte auf zusätzliche Proteinbanden bzw. auf Unterschiede im Bandenmuster hin vergleichen.

Abweichend von der Vorschrift (siehe 3.2.3.7) wurden 500ml statt 2l Kultur eingesetzt. Die weiteren Bedingungen wurden nicht verändert. Ein Proteinextrakt des Wildtyp-Stammes BY4741 sowie Extrakte von Bet3-TAP und Trs85-TAP wurden über eine SDS-PAGE separiert, mit colloidalem Coomassie gefärbt und die Banden der einzelnen Extrakte verglichen. Wie in Abbildung 4.19A zu sehen, ist nahezu kein Unterschied in den Bandenmustern zu erkennen.

Um zu sehen, ob die Aufreinigung überhaupt zu einer Anreicherung von Bet3-TAP und Trs85-TAP in den Proteinextrakten geführt hat, wurde mit diesem Gel eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

Abbildung 4.19: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit BY4741 (wt), Bet3-Tap und Trs85-TAP ohne 2. Aufreinigungsschritt

A: Zellen der Stämme BY4741, S288C Bet3-TAP und S288C Trs85-TAP wurden bei einer OD_{600} von 2 geerntet und nach dem TAP-Protokoll aufgeschlossen, die Proteinextrakte über die erste Säule aufgereinigt und in einem 10%-SDS-Gel separiert und mit colloidalem Coomassie gefärbt. **B:** Mit dem Gel aus A wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Der Immunoblot mit Antikörper gegen den TAP-Tag zeigt, dass Bet3-TAP und Trs85-TAP in den jeweiligen Präparaten vorhanden waren.

In dem Immunoblot mit Antikörper gegen den TAP-Tag ist zu sehen, dass beide Proteine in den Extrakten vorlagen (Abbildung 4.19B). Die Nachweisempfindlichkeit eines Immunoblots ist wesentlich höher als die einer Färbung mit Coomassie. Im Vergleich der Signale von Bet3-TAP zu Trs85-TAP im Immunoblot, liegt Trs85-TAP in weit geringerer Menge im jeweiligen Proteinextrakt vor.

In einem weiteren Versuch ohne zweiten Aufreinigungsschritt wurde erneut ein Proteinextrakt von Trs85-TAP durch eine SDS-PAGE separiert und mit colloidalem Coomassie gefärbt. Die Mehrzahl der Banden des Extrakts von Trs85-TAP wurde massenspektroskopisch identifiziert (Abbildung 4.20). Es konnte in dem Gel weder Trs85-TAP selbst noch ein anderes Protein der TRAPP-Komplexe identifiziert werden.

Abbildung 4.20: Coomassie-gefärbtes Gel der TAP-Aufreinigung mit Trs85 ohne 2. Aufreinigungsschritt

Zellen des Stammes BY4741 Trs85-TAP wurden bei einer OD_{600} von 2 geerntet und nach dem TAP-Protokoll aufgeschlossen, der an Trs85-TAP gebundene Komplex über die erste Säule aufgereinigt und in einem 10%-SDS-Gel separiert. Die einzelnen Proteinbanden wurden in einem In-Gel-Verdau tryptisch in Peptide aufgespalten und diese durch MALDI-TOF Massenspektroskopie analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch BLASTP-Suche mit Hilfe der MASCOT Datenbank (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

4.7 Analyse des Wachstums von Autophagie-Mutanten unter ER-Stress

Es wurde gezeigt, dass die Inkubation von Hefezellen in Medium mit Tunicamycin (TM) oder Dithiotreitol (DTT) zur Proliferation des ER führt und die UPR-Aktivität hochreguliert. Einer Studie zufolge führt der so erzeugte ER-Stress zur Induktion von Autophagie (Yorimitsu *et al.*, 2006). Bisher konnte weiterhin gezeigt werden, dass Atg1, Atg8, Atg9, Atg16, Atg19 und Atg20 für das Wachstum unter ER-Stress wichtig sind (Bernales *et al.*, 2006a).

Um zu untersuchen, welche weiteren Autophagie-Proteine für das Wachstum unter Einfluss von Tunicamycin benötigt werden, wurden eine Reihe von Deletionsstämmen, aufgeführt in Tabelle 4.7, auf YPD-Platten mit 2,5µg/ml TM inkubiert. Je Stamm wurden dafür 4µl unverdünnte Kultur und vier Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) auf die Selektionsplatten aufgetropft. Zur Kontrolle wurden die gleichen Verdünnungen auf YPD-Platten ohne Selektion aufgetropft und parallel für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert (siehe 3.2.3.10). Anschließend erfolgte eine Analyse des Wachstums der einzelnen Stämme.

Die Verdünnung einer Hefekultur von 1:100 ist ausreichend um Hefezellen als Einzelkultur wachsen zu lassen und somit das Wachstum auf toten Zellen zu verhindern. Aus diesem Grund wurde das Wachstum der Zellen bei dieser Verdünnung mit dem Wachstum der Wildtypzellen des Stammes BY4741 (Positivkontrolle) und denen des Deletionsstammes *ire1Δ* (Negativkontrolle) verglichen und kategorisiert (kein oder reduziert im Wachstum bzw. ohne Wachstumsdefekt). Ire1 ist der Primärsensor für ungefaltete Proteine im ER, dessen Aktivierung über mehrere Schritte zur Induktion der UPR führt. Unter Wachstumsbedingungen, welche die Aktivierung der UPR auslösen, ist Ire1 daher essentiell. Das Ergebnis des Versuchs ist in den Abbildungen 4.21 und 4.22 zu sehen sowie in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Dargestellt ist eines von vier voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Stämme *atg1Δ*, *atg2Δ*, *atg3Δ*, *atg6Δ*, *atg11Δ*, *atg14Δ*, *atg16Δ*, *atg26Δ*, *atg31Δ*, *vam3Δ*, *vam7Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ*, *vps28Δ*, *vps45*, *vps52Δ*, und *trs65Δ* sowie die Negativkontrolle *ire1Δ* zeigen keinerlei Wachstum bei einer Verdünnung der Ausgangskultur von 1:100 und sind für das Wachstum auf unter ER-Stress essentiell. Signifikant im Wachstum reduziert sind die Stämme *atg5Δ*,

atg7Δ, atg9Δ, atg12Δ, atg13Δ, atg15Δ, atg17Δ, atg19Δ, atg20Δ, atg22Δ, atg21Δygr223cΔ, atg21Δatg18Δygr223cΔ, tlg2Δ, vps51Δ und yol083wΔ. Gering im Wachstum reduziert sind die Stämme *atg4Δ, atg8Δ, atg10Δ, atg18Δ, atg23Δ, atg27Δ, atg29Δ, atg21Δatg18Δ* und *vps53Δ*. Keinen Wachstumsdefekt hingegen zeigen die Stämme BY4741, *atg21Δ, atg24Δ, ygr223cΔ, trs33Δ und trs85Δ*. Die Kontrollen auf Platten ohne TM belegen, dass alle Stämme ohne induzierten ER-Stress normal wachsen.

Tabelle 4.7: Liste der auf Tunicamycin-Sensitivität analysierten Stämme.

Wachstum				Wachstum			
Stamm	wt	reduziert	nein	Stamm	wt	reduziert	nein
BY4741 (+)	+			<i>atg23Δ</i>		+	
<i>ire1Δ (-)</i>			+	<i>atg24Δ</i>	+		
<i>atg1Δ</i>			+	<i>atg26Δ</i>			+
<i>atg2Δ</i>			+	<i>atg27Δ</i>		+	
<i>atg3Δ</i>			+	<i>atg29Δ</i>		+	
<i>atg4Δ</i>		+		<i>atg31Δ</i>			+
<i>atg5Δ</i>		+		<i>ygr223cΔ</i>	+		
<i>atg6Δ</i>			+	<i>atg21Δatg18Δ</i>		+	
<i>atg7Δ</i>		+		<i>atg21Δygr223cΔ</i>		+	
<i>atg8Δ</i>		+		<i>atg21Δatg18Δygr223cΔ</i>		+	
<i>atg9Δ</i>		+		<i>vps4Δ</i>			+
<i>atg10Δ</i>		+		<i>vps27Δ</i>			+
<i>atg11Δ</i>			+	<i>vps28Δ</i>			+
<i>atg12Δ</i>		+		<i>vam3Δ</i>			+
<i>atg13Δ</i>		+		<i>vam7Δ</i>			+
<i>atg14Δ</i>			+	<i>vps45Δ</i>			+
<i>atg15Δ</i>		+		<i>vps51Δ</i>		+	
<i>atg16Δ</i>			+	<i>vps52Δ</i>			+
<i>atg17Δ</i>		+		<i>vps53Δ</i>		+	
<i>atg18Δ</i>		+		<i>tlg2Δ</i>		+	
<i>atg19Δ</i>		+		<i>trs33Δ</i>	+		
<i>atg20Δ</i>		+		<i>trs65Δ</i>			+
<i>atg21Δ</i>	+			<i>trs85Δ</i>	+		
<i>atg22Δ</i>		+		<i>yol083wΔ</i>		+	

wt = wächst wie Wildtyp bei einer Verdünnung von 1:100

reduziert = Wachstum im Vergleich zum Wildtyp bei einer Verdünnung von 1:100 signifikant reduziert

nein = kein Wachstum bei einer Verdünnung von 1:100

Abbildung 4.21: Verdünnungsreihen verschiedener Deletionsstämme auf Platten mit und ohne Tunicamycin (Teil 1).

Von stationären Zellen verschiedener Stämme (siehe Tabelle 4.7) wurden 4µl Kultur unverdünnt und vier Verdünnungen von 1:10-1:10000 auf YPD-Platten mit 2,5µg/ml TM und ohne TM getropft. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum der einzelnen Stämme analysiert und mit dem Wachstum der Positivkontrolle BY4741 und der Negativkontrolle *ire1Δ* verglichen (siehe Tabelle 4.7).

Abbildung 4.22: Verdünnungsreihen verschiedener Deletionsstämme auf Platten mit und ohne Tunicamycin (Teil 2).

Von stationären Zellen verschiedener Stämme (siehe Tabelle 4.7) wurden 4 μ l Kultur unverdünnt und vier Verdünnungen von 1:10-1:10000 auf YPD-Platten mit 2,5 μ g/ml TM und ohne TM getropft. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum der einzelnen Stämme analysiert und mit dem Wachstum der Positivkontrolle BY4741 und der Negativkontrolle *ire1Δ* verglichen (Tabelle 4.7).

4.7.1 Analyse der durch ER-Stress induzierten Makroautophagie anhand des Abbaus von GFP-Atg8

Mit Hilfe des Fusionsproteins GFP-Atg8 ist es möglich Autophagie in Hefezellen zu verfolgen und zu analysieren. Atg8 ist Autophagie-induziert und wird in der Vakuole nach Lyse der Autophagosomen abgebaut, wodurch freies GFP entsteht. Die Stabilität von freiem GFP gegenüber vakuolären Proteasen führt zu dessen Akkumulation in der Vakuole. In einem Immunoblot kann daher freies GFP

detektiert und zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Autophagie genutzt werden.

Bisher wurde gezeigt, dass das Level von GFP-Atg8 in Hefezellen nach Induktion von ER-Stress durch Inkubation mit 3mM DTT zunahm und somit GFP-Atg8 durch ER-Stress induziert wird. Yorimitsu *et al.* konnten, im Gegensatz zu Bernales *et al.*, zusätzlich den Abbau von GFP-Atg8 in der Vakuole beobachten (Bernales *et al.*, 2006a; Yorimitsu *et al.*, 2006).

Um diesen Widerspruch auszuräumen wurde zunächst GFP-Atg8 in die Stämme BY4741, *pep4Δ*, *hac1Δ*, *ire1Δ* und *atg1Δ* transformiert. Der Wildtypstamm BY4741 diene als Positivkontrolle. In der Negativkontrolle *pep4Δ* werden Autophagosomen gebildet und in die Vakuole transportiert, aber nicht lysiert. In *atg1Δ*-Zellen ist die Autophagie hingegen komplett blockiert. In beiden Stämmen wird GFP-Atg8 somit nicht in der Vakuole abgebaut.

Zur Überprüfung des Abbaus von GFP-Atg8 wurden wachsende Zellen der transformierten Stämme in CM ohne DTT als Negativkontrolle und in CM mit 3mM DTT (Induktion von ER-Stress) sowie SD-N (Induktion von Autophagie) für 24h inkubiert und zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 24h jeweils die OD₆₀₀ gemessen und 1 OD₆₀₀ Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte durch ein 10% SDS-Gel separiert. Im folgenden Immunoblot mit Antikörper gegen GFP (Abbildung 4.23) ist zu sehen, dass im Wildtypstamm BY4741 unter Hungerbedingungen (SD-N) GFP-Atg8 bereits nach 2h in der Vakuole abgebaut wird. Nach 24h ist aber auch unter Wachstumsbedingungen (CM) und im geringen Maße auch unter ER-Stress (CM+3mM DTT) der Abbau von GFP-Atg8 zu erkennen. Die Negativkontrollen *pep4Δ* und *atg1Δ* zeigen keinen Abbau von GFP-Atg8. *Ire1Δ*-Zellen zeigen autophagische Aktivität bereits nach 4h unter Wachstumsbedingungen und *hac1Δ*-Zellen nach 6h. Beide Stämme zeigen keine Autophagie unter ER-Stress in den ersten Stunden aber wie im Wildtyp ist auch nach 24h autophagischer Abbau zu sehen. Hingegen ist in beiden Stämmen unter Hungerbedingungen bereits nach 2h hohe autophagische Aktivität zu sehen.

Abbildung 4.23: Analyse der ER-Stress-induzierten Makroautophagie am Abbau von GFP-Atg8.

Der Abbau von GFP-Atg8 wurde in wachsenden Zellen (CM), unter ER-Stress (CM+3mM DTT) und in gehungerten Zellen (SD-N) der Stämme BY4741, *pep4Δ*, *hac1Δ*, *ire1Δ*, *atg1Δ* und *atg19Δ* über einen Zeitraum von 24h durch Nachweis von freiem GFP im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörper verfolgt. Pro Zeitpunkt wurden 1 OD₆₀₀-Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte in einem 10% SDS-Gel separiert.

Die Negativkontrollen *pep4Δ* und *atg1Δ* zeigen keinen Abbau von GFP-Atg8. BY4741, *ire1Δ* und *hac1Δ* zeigen unter Hungerbedingungen nach 2h Abbau von GFP-Atg8. Nach 24h ist in BY4741 Abbau unter Wachstumsbedingungen (CM) und im geringen Maße unter ER-Stress (CM+3mM DTT) zu sehen. *Ire1Δ*-Zellen zeigen nach 4h Abbau von GFP-Atg8 unter Wachstumsbedingungen und *hac1Δ*-Zellen nach 6h. Beide Stämme zeigen freies GFP unter ER-Stress nach 24h. **h** = Stunde(n); **GFP-Atg8** (40 kDa); **GFP** (26 kDa)

Atg19 ist ein Rezeptorprotein das essentiell für den Cvt-Weg ist aber nicht für Autophagie (Leber *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2001). Bei PMN zeigt *atg19Δ* keine Auffälligkeit jedoch sind *atg19Δ*-Zellen TM-sensitiv (Bernales *et al.*, 2006a; Krick *et al.*, 2008b). In diesem Versuch ist der Abbau von GFP-Atg8 in *atg19Δ*-Zellen vergleichbar mit dem Wildtyp.

4.7.2 Analyse der ER-Stress-induzierten Makroautophagie anhand des Abbaus von Pgk1-GFP

Das Protein 3-Phosphoglycerat Kinase (Pgk1) ist ein zytosolisches Protein und Bestandteil der Glykolyse und Glukoneogenese. Der Transport von Pgk1 zur Vakuole erfolgt durch unselektive Makroautophagie. Dabei wird Pgk1 unspezifisch mit weiterem zytosolischem Material in Autophagosomen eingeschlossen und zur Vakuole transportiert. Analog zu GFP-Atg8 gilt auch für das Fusionsprotein Pgk1-GFP, dass Pgk1 in der Vakuole nach Lyse der Autophagosomen abgebaut wird. Durch Nachweis des entstandenen freien GFPs im Immunoblot ist es daher möglich zu sehen, ob Pgk1-GFP in verschiedenen Stämmen und unter verschiedenen Bedingungen in die Vakuole transportiert wird.

Nach der Transformation des Plasmids Pgk1-GFP in die Stämme BY4741, *pep4Δ*, *hac1Δ*, *ire1Δ* und *atg1Δ* wurden zur Überprüfung der Autophagie-Induktion wachsende Zellen der transformierten Stämme in Selektionsmedium (CM) ohne DTT als Negativkontrolle und in CM mit 3mM DTT (Induktion von ER-Stress) sowie SD-N (Induktion von Autophagie) für 6h inkubiert und zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 6h jeweils die OD₆₀₀ gemessen und 1 OD₆₀₀ Zellen entnommen. Nach dem Aufschluss der Zellen durch alkalische Lyse wurde die Proteinextrakte durch ein 10% SDS-Gel separiert. Im Immunoblot mit Antikörper gegen GFP (Abbildung 4.24) ist zu sehen, dass Pgk1-GFP im Wildtypstamm BY4741 (Positivkontrolle) nur unter Hungerbedingungen, aber bereits nach 2h in der Vakuole abgebaut wird. In den Negativkontrollen *pep4Δ* und *atg1Δ* ist wie erwartet unter keiner Bedingung ein Abbau von Pgk1-GFP zu sehen.

Hac1Δ- und *ire1Δ*-Zellen zeigen wie der Wildtyp autophagische Aktivität in SD-N bereits nach 2h, aber unter ER-Stress und optimalen Kulturbedingungen wie alle anderen Stämme keine Autophagie. *Atg19Δ*-Zellen mit Pgk1-GFP zeigen wie erwartet in diesem Versuch den Wildtyp-Phänotyp.

Abbildung 4.24: Analyse der ER-Stress-induzierten Makroautophagie am Abbau von Pgk1-GFP.

Der Abbau von Pgk1-GFP wurde in wachsenden Zellen (CM), unter ER-Stress (CM+3mM DTT) und in gehungerten Zellen (SD-N) in den Stämmen BY4741, *pep4* Δ , *hac1* Δ , *ire1* Δ , *atg1* Δ und *atg19* Δ über einen Zeitraum von 6h durch Nachweis von freiem GFP im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörper verfolgt. Pro Zeitpunkt wurden 1 OD₆₀₀-Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte in einem 10% SDS-Gel separiert.

Die Negativkontrollen *pep4* Δ und *atg1* Δ zeigen keinen Abbau von Pgk1-GFP. BY4741, *ire1* Δ und *hac1* Δ zeigen unter Hungerbedingungen nach 2h Abbau von Pgk1-GFP. Unter Wachstumsbedingungen (CM) und ER-Stress (CM+3mM DTT) ist in allen Stämmen kein freies GFP zu sehen. **h** = Stunde(n); **GFP** (26 kDa); **Pgk1-GFP** (71 kDa)

4.7.3 Sec61-GFP als Markerprotein für ER-Phagie

Die Ergebnisse der Versuche mit GFP-Atg8 und Pgk1-GFP deuten darauf hin, dass ER-Stress keine Makroautophagie induziert und das Hac1 und Ire1 keine Funktion bei der Makroautophagie haben.

Um zu klären, ob der Abbau von Teilen des ER unter Stress über eine selektive Form der Autophagie stattfindet, wurde zunächst nach einen geeigneten Markerprotein gesucht. Tests mit chromosomal codiertem Kar2-GFP und Sec63-GFP (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass diese beiden Proteine nicht als Marker geeignet sind. Immunoblots mit beiden Fusionsproteinen zeigten weder

unter ER-Stress noch unter Hungerbedingungen freies GFP als Indiz für den Abbau der Proteine in der Vakuole.

Als nächster Kandidat wurde Sec61 getestet. Dieses essentielle Protein ist Bestandteil des heterotrimeren Sec61-Komplexes (*Translocon*). Dieser Komplex sitzt an der ER-Membran und bildet dort einen Kanal. Dieser wird für den Transport von Proteinen in das ER und von falsch gefalteten Proteinen aus dem ER hin zum 19S Proteasom benötigt (Übersicht bei (Osborne *et al.*, 2005)).

Um zu testen, ob Sec61-GFP geeignet ist den Abbau des ER in der Vakuole zu verfolgen, wurden Zellen des Hefestamms S288C Sec61-GFP (Huh *et al.*, 2003), in dem das chromosomale Sec61 mit GFP fusioniert wurde, untersucht. Die Zellen wurden für 6h ER-Stress ausgesetzt (YPD mit 2,5µg/ml TM bzw. YPD mit 3mM DTT) oder es wurde Autophagie induziert (SD-N). Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 6h wurde jeweils die OD₆₀₀ gemessen und 1 OD₆₀₀ Zellen entnommen. Nach dem Aufschluss der Zellen durch alkalische Lyse wurde die Proteinextrakte durch ein 10% SDS-Gel separiert. Im Immunoblot mit Antikörper gegen GFP (Abbildung 4.25) ist zu sehen, dass Sec61-GFP im Gegensatz zu GFP-Atg8 (Abbildung 4.23) und Pgk1-GFP (Abbildung 4.24) unter ER-Stress (Inkubation mit TM oder DTT) in die Vakuole gelangt, Sec61 abgebaut wird und GFP akkumuliert. Auch unter Hungerbedingungen (SD-N) wird, in deutlich geringerem Maße, Sec61-GFP in die Vakuole transportiert und abgebaut.

Das erste Experiment mit dem chromosomal integrierten Sec61-GFP gab Anlass Sec61-GFP in einen Vektor zu integrieren, um das entstehende Plasmid in verschiedenen Deletionsmutanten als Markerprotein für ER-Phagie zu verwenden.

Dazu wurde die chromosomale Sequenz von Sec61-GFP aus dem Stamm S228C Sec61-GFP mit Hilfe der Primer *Sec61-GFP forward2* und *Sec61-GFP reverse* durch PCR amplifiziert. Das so gewonnene DNA-Fragment wurde anschließend mittels der in die beiden Primer integrierten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *SpeI* und *EcoRI* geschnitten.

Abbildung 4.25: Analyse des Abbaus von Sec61-GFP unter ER-Stress.

Der Abbau von Sec61-GFP wurde unter ER-Stress (YPD+3mM DTT, YPD+2,5µg/ml TM) und Autophagie-Bedingungen (SD-N) im Stamm S288C Sec61-GFP über einen Zeitraum von 6h durch Nachweis im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörper verfolgt. Pro Zeitpunkt (0, 2, 4 und 6h) wurden 1 OD₆₀₀-Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte in einem 10% SDS-Gel separiert.

Zellen unter ER-Stress (YPD+3mM DTT und YPD+2,5µg/ml TM) zeigen freies GFP. Unter Hunger (SD-N) ist signifikant weniger freies GFP zu erkennen. **h** = Stunde(n); **GFP** (26 kDa); **Sec61-GFP** (79 kDa)

Das Zielplasmid pRS313 wurde ebenfalls mit den beiden Endonukleasen *SpeI* und *EcoRI* linearisiert und beide Fragmente ligiert. Das entstandene Plasmid pRS313-SEC61-GFP wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Anschließend wurde die Lokalisierung von Sec61-GFP in der Zelle im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurde zuerst das Plasmid in den Wildtypstamm BY4741 transformiert. Nach der Inkubation in Selektionsmedium wurde die Lokalisation des transformierten Sec61-GFP im Fluoreszenzmikroskop mit der Lokalisation des chromosomalen Sec61-GFP verglichen (siehe Abbildung 4.26). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die leichte Überexpression durch das Plasmid, verglichen mit der chromosomalen Variante, keinen Einfluss auf die Lokalisation hat.

Sec61-GFP ist in der Zelle um den Zellkern herum und im kortikalen ER lokalisiert. Die Expression der Plasmid-kodierten Variante von Sec61-GFP verursachte keine Änderung in der Lokalisation im Vergleich zur chromosomalen Variante.

Abbildung 4.26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von Sec61-GFP in *S. cerevisiae*.

Die Lokalisation von Plasmid-kodiertem Sec61-GFP wurde in wachsenden Zellen des Stammes BY4741 im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Als Referenz dienten Zellen des Stammes S288C Sec61-GFP die unter gleichen Bedingungen inkubiert (30°C Log-Phase) und mikroskopisch analysiert wurden. In beiden Fällen zeigt Sec61-GFP die gleiche Lokalisation um den Zellkern herum und im kortikalen ER.

Um zu testen, ob sich Sec61-GFP als Markerprotein zur Analyse der ER-Phagie eignet, und zu untersuchen, ob und welche Komponenten der autophagischen Maschinerie für den ER-Abbau benötigt werden, wurde das Plasmid pRS313-Sec61-GFP zusätzlich in die Stämme *pep4Δ*, *hac1Δ*, *ire1Δ*, *atg1Δ* und *atg19Δ* transformiert. Wachsende Zellen der transformierten Stämme wurden in Selektionsmedium (CM) als Negativkontrolle, mit 3mM DTT zur Induktion von ER-Stress sowie zur Autophagie-Induktion in SD-N für 24h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 24h wurde jeweils die OD₆₀₀ gemessen, 1 OD₆₀₀ Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte durch ein 10% SDS-Gel separiert. Der folgende Immunoblot mit Antikörper gegen GFP (Abbildung 4.27) zeigt, dass im Wildtypstamm BY4741 unter Hungerbedingungen (SD-N) bei 6h und 24h ein sehr schwaches Signal für freies GFP zu erkennen ist. ER-Stress durch Inkubation in Medium mit 3mM DTT führt dagegen schon nach 2h zum Abbau von Sec61-GFP. Im *pep4Δ*-Stamm ist unter keiner der Kulturbedingungen ein Abbau zu sehen. Dieser Befund zeigt, dass Sec61-GFP unter ER-Stress Pep4-abhängig in der Vakuole abgebaut wird.

Zellen von *hac1Δ* und *ire1Δ* zeigen im Gegensatz zum Wildtyp keinen Abbau unter ER-Stress dafür aber unter Hungerbedingungen. In *atg1Δ*-Zellen wird Sec61-GFP unter ER-Stress abgebaut. Dies deutet auf einen Atg1-unabhängigen

Prozess hin. In *atg19Δ* wird Sec61-GFP unter Hungerbedingungen und in Gegenwart von 3mM DTT abgebaut.

Von den Membranen wurden im Anschluss die Antikörper entfernt und im Immunoblot mit Anti-Pgk1-Antikörpern Pgk1 als Ladekontrolle detektiert.

Abbildung 4.27: Analyse des ER-Abbaus mittels Sec61-GFP unter ER-Stress (Experiment 1).

Der Abbau von Sec61-GFP wurde in wachsenden Zellen (CM), unter ER-Stress (CM+3mM DTT) und in gehungerten Zellen (SD-N) der Stämme BY4741, *pep4Δ*, *hac1Δ*, *ire1Δ*, *atg1Δ* und *atg19Δ* über einen Zeitraum von 24h durch Nachweis im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörper verfolgt. Pro Zeitpunkt wurden 1 OD₆₀₀-Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte in einem 10% SDS-Gel separiert.

In der Negativkontrolle *pep4Δ* ist kein Abbau von Sec61-GFP zu erkennen. In *atg1Δ* ist kein Abbau in CM und SD-N zu erkennen. *Atg1Δ*-Zellen zeigen Abbau unter ER-Stress (CM+3mM DTT). In BY4741 ist unter Wachstumsbedingungen (CM) und Hunger (SD-N) kein freies GFP zu erkennen. Unter ER-Stress (CM+3mM DTT) zeigt BY4741 nach 2h Abbau von Sec61-GFP. *Ire1Δ* und *hac1Δ* zeigen unter Hungerbedingungen nach 2h Abbau von Sec61-GFP jedoch nicht unter Wachstumsbedingungen mit und ohne DTT. Pgk1 dient als Ladekontrolle. **h** = Stunde(n); **GFP** (26 kDa); **Sec61-GFP** (79 kDa); **Pgk1** (45 kDa)

Eine Wiederholung des Experimentes führte dagegen zu einem widersprüchlichen Ergebnis. Wie in Abbildung 4.28 zu sehen, ist im Stamm BY4741 unter

Hungerbedingungen (SD-N) bei 2h bereits ein sehr schwaches Signal für freies GFP zu erkennen ist. Im ersten Experiment (Abbildung 4.27) ist erst nach 6h ein Signal zu erkennen. Inkubation in Selektionsmedium mit und ohne 3mM DTT führt dagegen nicht zum Abbau von Sec61-GFP. Dies widerspricht ebenfalls dem Ergebnis aus dem ersten Experiment. Dort wurde Sec61-GFP unter ER-Stress bereits nach 2 Stunden deutlich abgebaut.

Abbildung 4.28: Analyse des Abbaus von Sec61-GFP unter ER-Stress (Experiment 2).

Der Abbau von Sec61-GFP wurde in wachsenden Zellen (CM), unter ER-Stress (CM+3mM DTT) und in gehungerten Zellen (SD-N) der Stämme *BY4741*, *pep4Δ*, *hac1Δ*, *ire1Δ*, *atg1Δ* und *atg19Δ* über einen Zeitraum von 24h durch Nachweis im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörper verfolgt. Pro Zeitpunkt wurden 1 OD₆₀₀-Zellen entnommen, durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Proteinextrakte in einem 10% SDS-Gel separiert.

In den Negativkontrollen *pep4Δ* und *atg1Δ* ist kein Abbau von Sec61-GFP zu erkennen. In *BY4741* ist unter Wachstumsbedingungen (CM) und Hunger (SD-N) kein freies GFP zu erkennen. Unter ER-Stress (CM+3mM DTT) zeigt *BY4741* nach 2h Abbau von Sec61-GFP. *Ire1Δ* und *hac1Δ* zeigen unter Hungerbedingungen nach 2h Abbau von Sec61-GFP, jedoch nicht unter Wachstumsbedingungen mit und ohne DTT. Pgk1 dient als Ladekontrolle. **h** = Stunde(n); **GFP** (26 kDa); **Sec61-GFP** (79 kDa); **Pgk1** (45 kDa)

In den Stämmen *pep4Δ* und *atg1Δ* ist unter keiner der Kulturbedingungen ein Abbau zu sehen. Der Befund im *atg1Δ*-Stamm widerspricht dem Ergebnis aus dem ersten Experiment, da dort Sec61-GFP unter ER-Stress Atg1-unabhängig abgebaut wurde. Zellen von *hac1Δ* und *ire1Δ* zeigen wie der Wildtyp nur Abbau unter Hungerbedingungen. In *atg19Δ* wird Sec61-GFP unter allen drei Bedingungen abgebaut. Von den Membranen wurden im Anschluss die Antikörper entfernt und in einem Immunoblot mit Anti-Pgk1-Antikörpern Pgk1 als Ladekontrolle detektiert.

Weitere Wiederholungen des Experimentes (Daten nicht gezeigt) führten zu ähnlich widersprüchlichen Ergebnissen. Freies GFP war in einem Experiment in wachsenden Zellen zu sehen unter Hungerbedingungen hingegen nicht.

Die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar, daher scheint Sec61-GFP kein geeignetes Markerprotein für ER-Phagie zu sein.

5 Diskussion

5.1 Suche nach Bindungspartnern von Atg9 und Atg21 mit dem Split-Ubiquitin System

Der fortwährende Abbau nicht benötigter Proteine einer eukaryotischen Zelle wird durch zwei unterschiedliche Wege gewährleistet. Unter nährstoffreichen Bedingungen erfolgt der Abbau durch das 19S Proteasom im Zytosol. Nährstoffmangel führt dagegen zur Induktion von Makroautophagie (kurz: Autophagie). Dabei bilden sich von einer Doppelmembran umgebene Vesikel (Autophagosomen), die während ihrer Entstehung unspezifisch zytosolische Bestandteile und Zellorganellen umschließen (Klionsky, 2005; Takeshige *et al.*, 1992). Nach dem Transport fusioniert die äußere der beiden Membranhüllen mit der Vakuole und entlässt ein einlagiges autophagisches Vesikel in das Lumen. Dieses Vesikel wird lysiert und sein Inhalt in der Vakuole degradiert.

Im Unterschied zur Autophagie ist der Cvt (*Cytosol to vacuole targeting*)-Weg unter Wachstumsbedingungen aktiv und dient dem Transport von spezifischen Proteinen (z.B. proApe1) zur Vakuole. Viele der an Makroautophagie beteiligten Proteine sind gleichzeitig Bestandteil des Cvt-Wegs. Gemeinsam ist beiden Wegen der Ursprungsort: die PAS, welche als zentrales Organisationszentrum für die Vesikelbiogenese gilt (Klionsky, 2005). Bislang wurde für 20 von 31 Atg-Proteinen, die bei der Autophagie eine Rolle spielen, die Lokalisation an der PAS (Präautophagosomale Struktur) nachgewiesen. Von diesen sind 16 an der Bildung autophagischer Vesikel beteiligt (Suzuki *et al.*, 2007).

Eines dieser Proteine ist das integrale Membranprotein Atg9, dass sowohl an Autophagie als auch am Cvt-Weg beteiligt ist (Lang *et al.*, 2000; Noda *et al.*, 2000). Für Atg9 ist ein Zyklus beschrieben, in dessen Verlauf das Protein von einem peripheren Pool zur PAS und zurück transportiert wird (Reggiori *et al.*, 2005b; Reggiori *et al.*, 2004). Der anterograde Transport zur PAS erfolgt in Abhängigkeit von den Proteinen Atg11, Atg23 und Atg27 sowie Aktin. Der retrograde Transport von der PAS zum peripheren Pool benötigt den Atg1-Atg13-Komplex, den Atg2-Atg18-Komplex sowie den PI3-Kinase-Komplex (Reggiori *et al.*, 2005a; Yen *et al.*, 2007). Der einzige bisher bekannte Interaktionspartner von Atg9 ist Atg2 (Wang *et al.*, 2001).

5.1.1 Split-Ubiquitin Screen mit Atg9

Ein Ziel dieser Arbeit war es, weitere Interaktionspartner von Atg9 zu identifizieren. Dafür wurde das Split-Ubiquitin System gewählt. Dieses von N. Johnsson und A. Varshavsky entwickelte System (Johnsson und Varshavsky, 1994) bietet die Möglichkeit, Proteininteraktionen von schwer zugänglichen Proteinen (z.B. Membranproteinen) zu untersuchen, für die das Hefe 2-Hybridsystem ungeeignet ist. Verwendet wurde das kommerziell vertriebene *DUALmembrane Kit 2* der Firma Dualsystems Biotech.

Der Screen mit Atg9 resultierte unter den gewählten Selektionsbedingungen in dem Wachstum von 101 Kolonien. Durchgeführte Kontrollen und Sequenzierung der zu den möglichen Interaktionspartnern korrespondierenden cDNAs führten zur Identifizierung von 55 der 101 Klone (Tabelle 4.2).

Dabei wurden 33 Mal die für die 25S rRNA codierenden Gene *RDN25-1* und *RDN25-2* gefunden, welche zu den Loci *RDN37-1* bzw. *RDN37-2* gehören. Außerdem wurde zweimal das Gen *RPS1A/B* sowie einmal *RPS4A/B* und *RPS7A/B* gefunden. Diese codieren alle für Proteine der ribosomalen 40S Untereinheit. Die weiterhin je einmal gefundenen Gene *RPL10*, *RPL15A/B*, *RPL21A/B*, *RPL36A/B* und *RPL41A* codieren hingegen für Proteine der ribosomalen 60S Untereinheit.

Die in diesem Screen gefundenen möglichen Interaktionen zwischen Atg9 und ribosomalen Proteinen könnten auf eine Wechselwirkung während des Autophagie-Prozesses und der spezifischen Ribophagie hindeuten. Während der Ribophagie werden selektiv die 40S und 60S Untereinheiten der Ribosomen abgebaut. Für den Abbau der 60S Untereinheit sind die Ubiquitin Protease Ubp3 und deren Kofaktor Bre5 essentiell. Welche Proteine für den selektiven Abbau der 40S Untereinheit zuständig sind, ist bisher nicht bekannt (Kraft *et al.*, 2008). Ob jedoch Atg9 tatsächlich mit den gefundenen ribosomalen Proteinen interagiert und ob diese Interaktion funktionell relevant ist, ist jedoch fraglich. Denkbar wäre, dass während der Ribophagie eine räumliche Nähe von Atg9 und den gefundenen Proteinen entsteht, die für die Wiederherstellung des Split-Ubiquitin ausreicht.

Nicht auszuschließen wären allerdings auch unspezifische Interaktionen der Split-Ubiquitinhälften während bzw. nach der Translation von Atg9. Hierfür spricht auch die potentielle Interaktion mit dem zweimalig gefundenen Protein Ssb1/2 sein. Dabei handelt es sich um ein Ribosomenassoziiertes Chaperon der *HSP70*

Familie, die neu synthetisierte Proteine bei der Faltung unterstützen (Bukau und Horwich, 1998; Pfund *et al.*, 1998).

5.1.2 Split-Ubiquitin Screen mit Atg21

Die homologen Proteine Atg18 und Atg21 sind beide für den Cvt-Weg essentiell, für Autophagie aber nur Atg18 (Barth *et al.*, 2001, 2002; Dove *et al.*, 2004). Zudem wird Atg18 für PMN benötigt, während die Deletion von *ATG21* nur zur Reduktion der PMN-Aktivität führt (Krick *et al.*, 2008b). Atg18 bildet zusammen mit Atg2 einen Komplex, der weitere Atg-Proteine zur PAS rekrutiert. Atg21 spielt dagegen eine Rolle bei der Rekrutierung von Atg8 und dem Atg5-Atg12-Konjugat zur PAS (Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004).

Da für Atg21 bisher kein Bindungspartner bekannt ist, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, funktionelle Interaktionspartner von Atg21 zu identifizieren. Dies sollte ebenfalls mit Hilfe des Split-Ubiquitin Systems erreicht werden.

In dem *Screen* mit Atg21 wurden unter den gewählten Selektionsbedingungen 203 Kolonien gefunden. Nach Durchführung von Kontrollen und Sequenzierung der zu den möglichen Interaktionspartnern gehörenden cDNAs, konnten 178 der 203 Klone identifiziert werden (Tabelle 4.1).

Wie im *Screen* mit Atg9 wurden auch hier die für die 25S rRNA codierenden Gene *RDN25-1* und *RDN25-2* (25 Mal) gefunden. Ebenfalls wurden die Gene *RPL9A/B* (6 Mal), *RPL24A/B*, *RPL31A/B* und *RPL32*, die für Proteine der ribosomalen 60S Untereinheit codieren, identifiziert. Darunter sind auch Gene, die für Proteine der ribosomalen 40S Untereinheit codieren, wie *RPS29A/B* (2 Mal), *RPS1A/B*, *RPS6A/B*, *RPS7A/B*, *RPS11A/B*, *RPS24A/B* und *RPS30A* (jeweils einmal). Obwohl Atg21 nicht essentiell für Autophagie ist, jedoch eine Rolle bei selektiven Prozessen wie dem Cvt-Weg oder PMN spielt, ist denkbar, dass während des Abbaus von Ribosomen durch Ribophagie Atg21 und die gefundenen Proteine in räumliche Nähe zueinander kommen, was eine Wiederherstellung des Split-Ubiquitin bewirken könnte. Auch eine Interaktion während bzw. nach der Translation von Atg21 mit den potentiellen Bindungspartnern ist nicht auszuschließen. Ein Anzeichen dafür ist der 21-malige Fund der Gene *HYP2/ANB1*. Diese redundanten Gene codieren für den Translations-Initiationsfaktor eIF-5A.

Insgesamt am häufigsten (85 Mal) wurde das Gen *EGD2* gefunden. Dieses Gen codiert für die 18,7 kDa große Alpha-Untereinheit des heteromeren *nascent*

polypeptide-associated complex (NAC). Der Komplex ist mit zytoplasmatischen Ribosomen assoziiert und an der Sortierung von Proteinen sowie deren Translokation beteiligt (George *et al.*, 1998; Reimann *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1995).

5.1.3 *Egd2Δ*-Zellen zeigen keinen Cvt-Defekt

Zunächst wurde untersucht, ob *Egd2* eine Funktion beim Cvt-Weg hat. In *egd2Δ*-Zellen ist jedoch der Cvt-Weg nicht defekt (Abbildung 4.3). Zudem lokalisiert Atg21-GFP in *egd2Δ*-Zellen wie im Wildtyp (Abbildung 4.4).

Da *Egd2* mit zytoplasmatischen Ribosomen assoziiert ist, wäre die gefundene Wechselwirkung mit Atg21 ein erneuter Hinweis darauf, dass in dem verwendeten Split-Ubiquitin System Interaktionen eventuell häufiger während oder nach der Translation des Köderproteins stattfinden. Inwiefern das verwendete System zuverlässig arbeitet, ist nicht bekannt. In einem durchgeführten *Screen* mit Atg18 als Köderprotein, wurden ebenfalls viele der in dieser Studie gefundenen ribosomalen Proteine als möglicher Interaktionspartner identifiziert, Atg2 oder Vac17 jedoch nicht (persönliche Mitteilung Dr. C. Voss). Zudem konnte sogar in einem direkten Interaktionsexperiment von Atg9 mit Atg2 die bereits nachgewiesene Interaktion (Wang *et al.*, 2001) zwischen beiden Proteinen nicht gezeigt werden (persönliche Mitteilung S. Bremer).

5.2 Das PIP-Bindemotiv FRRG in der Atg18 Proteinfamilie

Die drei sequenzhomologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c haben in der Hefe unterschiedliche Funktionen. Bis heute ist bekannt, dass Atg18 für Autophagie, Pexophagy, PMN und den Cvt-Weg essentiell ist. Atg21 ist dagegen nur für den Cvt-Weg essentiell. *Atg21Δ*-Zellen zeigen aber für Autophagie und PMN eine deutliche Reduktion der autophagischen Aktivität. Die Aktivität von PMN in *ygr223cΔ* ist ebenfalls reduziert. Weitere Funktionen für Ygr223c sind nicht bekannt (Barth *et al.*, 2001, 2002; Dove *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2001; Krick *et al.*, 2008a; Krick *et al.*, 2008b).

Die drei homologen Proteine enthalten alle jeweils 7 WD-40 Domänen, die sich zu einem 7-blättrigen β -Propeller falten. Die so entstandene Struktur kann als Plattform für reversible Wechselwirkungen mit anderen Proteinen dienen (Proikas-Cezanne *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 1999). Gemeinsam ist den drei

Proteinen auch das in dem β -Propeller liegende konservierte FRRG-Motiv, das sowohl die Bindung an PI3P, PI4P und im geringeren Maße an PI5P sowie an Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P₂) ermöglicht (Dove *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2006; Stromhaug *et al.*, 2004).

Durch Mutation des FRRG-Motivs zu FTTG verliert Atg18 fast vollständig die Fähigkeit PI3P und PI(3,5)P₂ zu binden. Dies führt zum Verlust der Funktion während des Cvt-Wegs und verhindert den retrograden Transport von der Vakuole zum späten Endosom. Autophagie und Pexophagie sind jedoch weiterhin funktionell. In Atg21^{FTTG} führt die Mutation des Motivs zu einem partiellen Verlust, PIPs zu binden, der aber ausreicht, um den Cvt-Weg zu blockieren (Dove *et al.*, 2004; Krick *et al.*, 2006; Stromhaug *et al.*, 2004).

Obara *et al.* zeigten zusätzlich, dass die Komplexbildung von Atg18 mit Atg2 nicht von der PI3P-Bindung abhängig ist, aber für die Lokalisation des gebildeten Komplexes (Obara *et al.*, 2008).

Atg18, Atg21 und Ygr223c sind an perivakuolären Strukturen und an der Vakuolenmembran lokalisiert (Barth *et al.*, 2002; Meiling-Wesse *et al.*, 2004; Stromhaug *et al.*, 2004). Die perivakuolären Strukturen von Atg18, Atg21 und Ygr223c konnten kürzlich als Lokalisation am Endosom identifiziert werden. Die Lokalisation ist abhängig vom Vps34-Kinase-Komplex II, der am Endosom lokalisiert ist und spezifisch Vps38 enthält, nicht aber von Komplex I, der spezifisch Atg14 enthält und an der PAS lokalisiert ist (Krick *et al.*, 2008a).

5.2.1 Mutation von FRRG zu FTTG führt zur Misslokalisierung von Atg18 und Atg21

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Atg21^{FTTG}-GFP sowohl unter Wachstums- als auch unter Hungerbedingungen diffus im Zytosol lokalisiert (Abbildung 4.7 B). Dabei verliert Atg21^{FTTG}-GFP wie GFP-Atg18^{FTTG} (Abbildung 4.7 A) und (Dove *et al.*, 2004) die Lokalisation an der Vakuolenmembran und an den perivakuolären Strukturen. Es ist zusätzlich auffällig, dass deutliche Mengen an GFP-Atg18^{FTTG} im Zellkern akkumulieren (siehe auch (Krick *et al.*, 2006)).

Die Bindung von Atg18 an PI3P ist daher vermutlich für den Cvt-Weg wichtig, aber nicht für Autophagie oder eine geringe „Rest-Bindung“ reicht für die Autophagie-Funktion aus (Obara *et al.*, 2008). Der Verlust der Fähigkeit von Atg18^{FTTG} an PI(3,5)P₂ zu binden, scheint allerdings keine Funktion bei

Autophagie oder dem Cvt-Weg zu haben, da die PI3P 5-Kinase Fab1 für keinen der beiden Transportwege essentiell ist (Dove *et al.*, 2004; Epple *et al.*, 2003).

5.2.2 *Atg18Δ* zeigt einen schweren Defekt bei der Vakuolenfragmentierung

Fab1 bildet PI(3,5)P₂ an der vakuolären Membran. Die Deletion von *FAB1* führt zu einer unnatürlich großen Vakuole, wie es auch für *atg18Δ*-Zellen gezeigt wurde (Dove *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Fab1 für die Reaktion von Zellen auf osmotischen Stress wichtig ist (Bonangelino *et al.*, 2002; Dove *et al.*, 1997).

Ob die Proteine Atg21, Ygr223c und insbesondere Atg18 Einfluss auf die Vakuolenfragmentierung haben, sollte im Rahmen dieser Arbeit ermittelt werden. Die Vakuolen der Stämme *atg21Δ*, *ygr223cΔ* und *egd2Δ* (Abbildung 4.8) fragmentieren unter hyperosmotischen Bedingungen vergleichbar stark mit der Positivkontrolle BY4741 (wt). Besonders in *egd2Δ* ist die Fragmentierung stark ausgeprägt. Auch sind diese Zellen im Allgemeinen etwas größer. *Atg18Δ* verhält sich ähnlich wie die Negativkontrolle *fab1Δ*, hat aber im Vergleich etwas kleinere Vakuolen. Wie der Versuch gezeigt hat, fragmentieren die Vakuolen in *ygr223cΔ* auf Wildtypniveau (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.9). *Atg21Δ* zeigt dagegen schon eine Reduzierung auf etwa 60% der Fragmentierungsrate im Wildtyp. In *atg18Δ* ist die Fähigkeit zur Vakuolenfragmentierung auf 20% des Wildtypniveaus reduziert. Wie sich diese Reduktion auf die allgemeine Überlebensfähigkeit und andere Prozesse auswirkt ist bisher nicht untersucht.

5.2.3 Bindung von Atg18 an PI(3,5)P₂ ist wichtig für die Vakuolenfragmentierung

Atg18 hat also neben den Aufgaben in der Autophagie und im Cvt-Weg auch eine Funktion bei der Vakuolenfragmentierung als Antwort auf hyperosmotischen Stress. Diese Funktion ist dabei abhängig von der PIP-Bindestelle FRRG. Ein Komplementationsversuch des *atg18Δ*-Phänotyps mit einem Atg18-HA-Konstrukt zeigte eine vergleichbare Fragmentierungsrate wie der Wildtyp (Tabelle 4.5 sowie Abbildung 4.12 und 4.13). Das Atg18^{FTTG}-HA-Konstrukt zeigte jedoch eine drastische Reduzierung in der Fähigkeit zur Fragmentierung. Die Rate lag bei

24% der Rate des Atg18^{FTTG}-HA-Konstrukts und somit im Bereich der Rate von *atg18Δ*-Zellen.

5.2.4 Deletionsstämme der Atg18 Proteinfamilie zeigen eine leichte Reduktion der Vakuolenvererbung

In *S. cerevisiae* wird während der Zellteilung ein Teil der Vakuole von der Mutter- auf die Tochterzelle vererbt (Catlett und Weisman, 2000). Die Deletion von *FAB1* führt zu einem Defekt in der Vakuolenvererbung und wird der Klasse III Vererbungsmutanten zugeschrieben. Diese Mutanten haben sehr große Vakuolen, können die Vakuole nicht ansäuern und haben einen Defekt im retrograden Transport von der Vakuole (Übersicht siehe Weisman, 2003).

Zellen des Wildtypstammes BY4741 zeigten in über 87 % der beobachteten Teilungsereignisse eine Vererbung der Vakuole (Abbildung 4.10 und 4.11 sowie Tabelle 4.4). In den Negativkontrollen *vac1Δ* und *fab1Δ* wurde keine Vererbung beobachtet. *Atg18Δ* (75,3%), *atg21Δ* (76,3%), *ygr223cΔ* (89%) und *egd2Δ* (78,9%), zeigten jeweils eine reduzierte Vererbungsrate (Angaben in % beziehen sich auf die Wildtyptrate=100%). Ob die verringerten Vererbungsraten direkt auf das Fehlen der jeweiligen Proteine zurückzuführen ist, oder es sich um einen indirekten Phänotyp handelt, konnte bisher nicht gezeigt werden.

5.3 Überexpression von GFP-YGR223C führt zur Sekretion von CPY

Die Carboxypeptidase Y (CPY) wird als inaktive Proform synthetisiert und im ER nach Spaltung ihrer N-terminalen Signalsequenz N-glykosiliert und phosphoryliert (Hashimoto *et al.*, 1981; Hasilik und Tanner, 1978). Nach Transport zum Golgi-Apparat verlässt die p2-CPY-Form das TGN (PVC) und wird durch Bindung an seinen Rezeptor Vps10 mittels eines vakuolären Lokalisierungssignals im Propeptid zur Vakuole transportiert. Dort erfolgt die Reifung zum aktiven Enzym durch Proteinase A (Deloche *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 1994; Valls *et al.*, 1990).

Die Mutation in der GTP-bindenden Domäne der Rab-GTPase Vps21 am Endosom führt zur Fehlsortierung und Sekretion von CPY aus der Zelle (Horazdovsky *et al.*, 1994). Zusätzlich wurde Ygr223c in einem Hefe 2-Hybrid Screen als potentieller Bindungspartner von Vps21 identifiziert (Ito *et al.*, 2001). Die Deletion oder

Überexpression von *YGR223C* könnte daher zu Störungen der Funktion von Vps21 führen wodurch es zur Sekretion von CPY kommen könnte.

In einem Versuch mit den induzierbaren Plasmiden GFP-Atg18, GFP-Atg21 und GFP-Ygr223c zeigte sich, dass GFP-*YGR223C* exprimierende Zellen CPY sekretieren (Abbildung 4.14). Die sekretierte Menge ist geringer als in der Negativkontrolle *vps28Δ* mit pUG36-GFP (Leervektor). Vps28 ist eine Komponente des ESCRT-I Komplexes. Fehlt Vps28, führt dies zur Sekretion von CPY (Robinson *et al.*, 1988).

Möglicherweise interagiert GFP-Ygr223c mit einem bzw. mehreren Proteinen, welche für einen der Transportwege am Endosom wichtig sind. Die Überexpression von GFP-*YGR223C* könnte dazu führen, dass ein möglicher Bindungspartner durch einen Überschuss an Ygr223c titriert wird und nicht für seine Funktion zur Verfügung steht wodurch der CPY-Transportweg gestört werden könnte. Der Test auf CPY-Sekretion ist leicht durchführbar und gut auszuwerten und sollte daher zur Identifizierung des oder der Interaktionspartner von Ygr223c eingesetzt werden. Wird durch Überexpression und Bindung von Ygr223c an einen Bindungspartner der CPY-Transportweg oder ein endosomales Protein blockiert, dann sollte dieser Defekt durch gleichzeitige Überexpression der potentiellen Bindungspartner aufgehoben werden. In einem *Screen* mit einer Überexpressions-Genbank sollten dann diejenigen Kolonien, die keine CPY-Sekretion zeigen, Plasmide enthalten, die den potentiellen Bindungspartner codieren.

5.3.1 Suche nach Bindungspartnern für Ygr223c

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von Ygr223c wurden GFP-*YGR223C* und die Genbank AB320 (ATCC Nummer 37323) parallel exprimiert. In den Überexpressionsvektor der Genbank sind 5-20 kB lange DNA-Fragmente integriert, die in etwa 10000 Klonen das gesamte Hefe-Genom abdecken (Nasmyth und Reed, 1980b).

Im *Screen* wuchsen 20721 Kolonien. Nach der Auswertung (Abbildung 4.15 und Tabelle 4.6) blieben fünf unterschiedliche potentielle Interaktionspartner für GFP-Ygr223c übrig. *SRB8* codiert für eine Untereinheit des RNA Polymerase II Mediator Komplex (Hengartner *et al.*, 1995). Cdc45 ist ein DNA-Replikation Initiationsfaktor, Gcd2 ist dagegen die Delta-Untereinheit des

Translations-Initiationsfaktor eIF2B (Cigan *et al.*, 1993; Moir *et al.*, 1982). Aim21 und Otu2 sind Proteine mit unbekannter Funktion.

Wie sich herausgestellt hat, führt nur die Überexpression des Fusionskonstruktes *GFP-YGR223C* zur Sekretion von CPY. Die Überexpression der chromosomalen Gene der drei homologen Proteine Atg18, Atg21 und Ygr223c unter Einfluss des integrierten Promotors *GPD1* (Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase 1) führte jedoch zur CPY-Sekretion in Abhängigkeit von Atg21, aber nicht von Ygr223c. Einfach- oder Mehrfachdeletionen (unabhängig von der Kombination) der drei homologen Proteine zeigten keine Auswirkung auf den CPY-Transport oder den MVB-Weg (Krick *et al.*, 2008a).

Es wäre möglich, dass durch die Fusion von Ygr223c mit GFP die Tertiärstruktur von Ygr223c verändert wird. Auf Grund der Homologie zu Atg21 wäre es möglich, dass Bindungsmotive die in Ygr223c normalerweise unzugänglich sind, aber mit denen Atg21 an einen unbekannten Partner im CPY-Transport bindet, durch die Strukturänderung in Ygr223c für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zugänglich wären. Eine solche Änderung in der Tertiärstruktur durch Fusion mit GFP könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass die Überexpression von *GFP-ATG21* nicht zur CPY-Sekretion führt, die des Wildtyp-Gens hingegen schon. In diesem Fall würde die Strukturänderung in *GFP-Atg21* dazu führen, dass eine oder mehrere Bindungsstellen nicht mehr verfügbar wären und *GFP-Atg21* nicht mit einem Bindungspartner wechselwirken kann.

5.4 Suche nach Interaktionspartnern von Trs85 mit dem *Tandem Affinity Purification (TAP)*-System

Die TRAPP Komplexe sind funktionelle Bestandteile des frühen sekretorischen Transportwegs, die zuerst in Hefe beschrieben wurden (Sacher *et al.*, 2001). Die Komplexe befinden sich am Golgi-Apparat, wo sie Vesikel, die für die Fusion mit dem Golgi bestimmt sind, erkennen und binden (Barrowman *et al.*, 2000; Sacher *et al.*, 2001). TRAPP I besteht aus den sieben Untereinheiten Bet3, Bet5, Trs20, Trs23, Trs31, Trs33 sowie Trs85 und ist am Transport vom ER zum Golgi beteiligt. Der TRAPP II Komplex enthält zusätzlich zu den Proteinen des TRAPP I Komplexes Trs65, Trs120 und Trs130 und spielt eine Rolle beim retrograden Transport vom späten Golgi oder beim Transport aus dem frühen Golgi. Alle

Untereinheiten der beiden Komplexe bis auf Trs33, Trs65 und Trs85 sind in Hefe essentiell (Sacher *et al.*, 2001).

In *trs85Δ*-Zellen ist der Cvt-Weg komplett blockiert und Autophagie findet mit 50% der Effizienz des Wildtyps statt (Meiling-Wesse *et al.*, 2005). In einer neueren Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass Trs85 für PMN essentiell ist (Krick *et al.*, 2008b).

Somit besitzt Trs85 nicht nur für den Cvt-Weg eine spezifische Funktion. Mit welchen Proteinen Trs85 für seine Funktion in diesen Wegen interagiert, ist nicht bekannt. Diese Daten legen nahe, dass Trs85 auch außerhalb der TRAPP-Komplexe eine Funktion besitzt. Ob es sich dabei um einen neuen Subkomplex von TRAPP handelt oder ein neuer Proteinkomplex vorliegt, sollte durch Identifizierung neuer Bindungspartner für Trs85 geklärt werden.

5.4.1 Etablierung des TAP Systems mit Bet3-TAP

Um weitere Interaktionspartner für Trs85 zu finden, wurde die TAP-Methode eingesetzt (Puig *et al.*, 2001). Zunächst wurde zur Etablierung der Methode das Fusionsprotein Bet3-TAP verwendet. Bet3 wurde in den Studien von Sacher für die Isolation der TRAPP-Komplexe verwendet (Sacher *et al.*, 2001). Somit konnten geeignete Bedingungen für die TAP-Aufreinigung etabliert werden, um diese Bedingungen für weitere Proteine zu verwenden. Es gelang, den TRAPP II Komplex mit Ausnahme der Untereinheit Trs130 aufzureinigen (Abbildung 4.16).

5.4.2 Anwendung TAP Systems mit Trs85-TAP

Die für Bet3-TAP ermittelten Bedingungen bei der Aufreinigung des Komplexes wurden für die Versuche mit Trs85-TAP verwendet. In diesen Experimenten konnten nach der Aufreinigung drei TRAPP Komponenten, Trs20, Trs31 und Trs33, identifiziert werden (Abbildung 4.17 und 4.18). Zusätzlich wurden einige Proteine, zum Teil wiederholt, gefunden, die wahrscheinlich unspezifisch während der Aufreinigung binden. Weitere Proteine, die auf Funktionen in Autophagie oder dem Cvt-Weg hindeuten, konnten nicht identifiziert werden. Probleme bereitete die Reproduzierbarkeit der Aufreinigungen mit Trs85-TAP. Die Anzahl der im Coomassie-Gel dargestellten Banden variierte bei der Reproduktion des Experimentes. Der Einsatz von Proteaseinhibitoren konnte gelegentlich die partielle Degradation von Proteinen nicht verhindern.

In weiteren Versuchen wurde auf den zweiten Reinigungsschritt mit Hilfe des Calmodulin Bindepeptids verzichtet. Der Nachteil dieser Methode ist gesteigerte Zahl unspezifisch bindender Proteine. Wie erwartet, wurde eine höhere Zahl unspezifisch bindender Proteine gefunden als in Versuchen mit dem zweiten Reinigungsschritt (Abbildung 4.20). Auch nach Modifizierung des Protokolls konnte kein potentieller Bindungspartner von Trs85 identifiziert werden. In einer Gegenüberstellung verschiedener Extrakte (Abbildung 4.19) ist zu sehen, dass es nahezu keine Unterschiede in den Bandenmustern der gezeigten Stämme gibt. Die Western-Blot Analyse belegt aber, dass Bet3-TAP und Trs85-TAP im separierten Extrakt vorhanden sind. Dabei ist Trs85-TAP in weitaus geringerer Menge vorhanden als Bet3-TAP.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Aufreinigung mit Trs85-TAP wäre zum einen, dass die Wechselwirkungen von Trs85 mit anderen Proteinen im Komplex schwächer sind als die von Bet3. Der Aufschluss der Zellen oder starke Zentrifugation sowie Schwankungen im Versuchsablauf, z.B. Temperatur, könnten daher bereits zu einem Verlust von Interaktionen führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die Fusion von Trs85 mit dem TAP-Tag, Änderungen in der Tertiärstruktur entstehen, wodurch Bindungsmotive nicht mehr verfügbar wären oder durch sterische Behinderungen Wechselwirkungen schwächer würden.

Weiterhin wäre es möglich, dass Trs85 instabiler ist als Bet3. Dies wäre eine Erklärung für die geringere Ausbeute von Trs85 in den Versuchen, verglichen mit Bet3.

5.5 Analyse der spezifischen Autophagie des ERs: ER-Phagie

Ausgangspunkt für die meisten integralen Membranproteine und andere Proteine, die den sekretorischen Transportweg durchlaufen, ist das ER (Wickner und Schekman, 2005). Im ER erhalten die Proteine durch ER-gebundene Chaperone ihre richtige Konformation und werden bei Bedarf modifiziert. Nur korrekt gefaltete und modifizierte Proteine verlassen das ER. Zellen kontrollieren neben der Anzahl an Chaperonen im ER und der Menge der importierten Proteine auch den Abbau ungefalteter bzw. fehlgefalteter Proteine (Ellgaard und Helenius, 2003; McCracken und Brodsky, 2005; van Anken und Braakman, 2005).

Diese Kontrolle wird von der UPR (*unfolded protein response*) durchgeführt, die in einem Signalweg vom ER zum Zellkern für schnelle Adaption des ER sorgt (Bernales *et al.*, 2006b). Primärer Sensor für ungefaltete Proteine ist die Kinase/Endoribonuklease Ire1 (Cox *et al.*, 1993; Credle *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 1993). Die Aktivierung der zytosolischen Endoribonuklease-Domäne von Ire1 führt zur Entfernung eines Introns aus der HAC1 mRNA, was zur Produktion des Transkriptionsaktivators Hac1 führt (Cox und Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996). Dadurch werden die UPR Zielgene aktiviert, wodurch die Anzahl von Chaperonen und modifizierenden Enzymen im ER gesteigert wird. Parallel dazu wird die Aktivität von ERAD (*ER-Associated protein degradation*) stimuliert (Friedlander *et al.*, 2000). Dies führt zur Retranslokation von un- bzw. falsch gefalteten Proteinen aus dem ER ins Zytosol, zur Ubiquitinierung und zum Abbau durch das Proteasom (Kostova und Wolf, 2003; Meusser *et al.*, 2005).

UPS (Ubiquitin-Proteasom System) und Autophagie sind die beiden Hauptwege für den Proteinabbau. Die schnelle Adaption an die Bedürfnisse einer Zelle wird durch das UPS geregelt. Autophagie sorgt für den selektiven Abbau von Protein-Aggregaten sowie geschädigter oder überzähliger Organellen (Mizushima, 2007). Über die Existenz der selektiven Autophagie des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Phagie) ist bisher wenig bekannt. Inkubation in Medium mit Dithiothreitol (DTT) oder Tunicamycin (TM) führt zur Induktion von ER-Stress. Dieser äußert sich in der Induktion der UPR, in der Proliferation des ERs sowie in der Zunahme von Atg8. Zudem erhöht sich die Anzahl der PAS pro Zelle und UPR wird induziert (Bernales *et al.*, 2006a; Yorimitsu *et al.*, 2006).

Zudem wurde gezeigt, dass Zellen mit Deletion des UPR Gens *HAC1* und einige Autophagiemutanten (*atg1Δ*, *atg8Δ*, *atg9Δ*, *atg16Δ*, *atg19Δ* und *atg20Δ*) nicht auf Platten mit 1,0 µg/ml TM wachsen und daher diese Gene für das Überleben der Zellen unter starkem ER-Stress essentiell sind (Bernales *et al.*, 2006a).

Sowohl Bernales *et al.* als auch Yorimitsu *et al.* haben gezeigt, dass ER-Stress Atg8 induziert. In der Studie von Yorimitsu *et al.* konnte gezeigt werden, dass GFP-Atg8 nach sechs Stunden unter ER-Stress in der Vakuole abgebaut wird (Yorimitsu *et al.*, 2006). Bernales *et al.* konnten hingegen den Abbau von GFP-Atg8 unter ER-Stress nicht nachweisen (Bernales *et al.*, 2006a).

Vielmehr zeigten Bernales *et al.* elektronenmikroskopische Bilder mit Strukturen, die sie als ERAs (*ER-containing Autophagosomes*) bezeichneten. Diese Strukturen beinhalten große Mengen an ER-Material. Dabei ist die äußere Membran der ERAs

dicht mit Ribosomen besetzt, die im Inneren der ERAs weitestgehend fehlen. Die Bildung der ERAs ist dabei ER-Stress induziert und Atg8-abhängig. Die Produktion des aktiven Transkriptionsaktivators Hac1ⁱ erhöhte das Atg8-Level, reichte aber nicht für Bildung von ERAs aus. Das legt nahe, dass die Induktion der ER-Phagie einen zusätzlichen, von Ire1 und Hac1 unabhängigen, Signalweg erfordert. In Zellen ohne Atg8 werden keine ERAs gebildet. Die gebildeten ERAs bleiben erhalten, solange der ER-Stress anhält. Verschwindet dieser Stress, können ERAs mit der Vakuole fusionieren. Interessant ist, dass das Verpacken von ER-Material in die ERAs für das Überleben der Zelle ausreichend ist (Bernales *et al.*, 2006a). Dies könnte erklären, warum GFP-Atg8 in der genannten Studie unter ER-Stress nicht in der Vakuole abgebaut wird. Wie nach abklingendem ER-Stress die Fusion der ERAs mit der Vakuole vermittelt wird, ist bisher unbekannt.

Somit wurden zwei unterschiedliche Wege beschrieben, wie Zellen unter ER-Stress überleben könnten. Durch Abbau des ERs über Autophagie oder durch Lagerung des geblähten ERs in ERAs und späterem Abbau nach Abklingen des Er-Stresses.

5.5.1 Viele Autophagie-relevante Proteine sind wichtig für das Zellwachstum unter ER-Stress

Um zu untersuchen, ob weitere Proteine der autophagischen oder verwandter Prozesse ebenfalls für das Überleben unter ER-Stress wichtig sind, wurden verschiedene Deletionsstämme auf ihr Wachstum unter Einfluss von ER-Stress getestet (Abbildung 4.21 und 4.22 sowie Tabelle 4.7).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Atg1 und Atg16 für das Wachstum auf TM essentiell sind. Für *atg8Δ*, *atg9Δ*, *atg19Δ* und *atg20Δ* hingegen wurde gezeigt, dass sie bei dem zugrunde gelegten Maßstab (Wachstum bei einer Verdünnung von 1:100 im Vergleich zum Wildtyp) im Wachstum signifikant reduziert sind. Fast alle untersuchten Deletionsstämme waren zumindest im Wachstum reduziert. Wildtyp-ähnliches Wachstum zeigten neben *trs33Δ* und *ygr223cΔ* nur die Cvt-spezifischen Proteine *atg21Δ*, *atg24Δ*, und *trs85Δ*, die allerdings reduzierte Aktivität bei PMN zeigen (*atg21Δ* und *atg24Δ*), bzw. essentiell für diesen Prozess sind (*trs85Δ*) (Krick *et al.*, 2008b).

Wesentlich für das Wachstum auf TM sind verschiedene Proteine aus unterschiedlichen Bereichen der Autophagie. So werden Atg14 und Atg6 aus dem

Autophagie-spezifischen PI3-Kinase Komplex benötigt. Dies gilt auch für das Ubiquitin-ähnliche Konjugationssystem. So sind *atg3Δ* und *atg16Δ* lethal und die Deletionsmutanten der anderen beteiligten Proteine zum Teil sehr stark im Wachstum reduziert. Auch Proteine aus dem Atg9-Cycling sind beteiligt. Atg1 und Atg2 sind essentiell, während das Wachstum beim Fehlen der übrigen beteiligten Proteine zum Teil nur stark reduziert ist.

Auch einige Cvt-spezifische Proteine sind essentiell für das Überleben unter ER-Stress, wie Atg11. Dies ist auch für PMN beschrieben (Krick *et al.*, 2008b). Atg11 dient unter anderem als Gerüst für die Organisation der PAS während des Cvt-Wegs und möglicherweise auch bei der Makro- und Mikropexophagie in *P. pastoris* (Yorimitsu und Klionsky, 2005a). Ebenso essentiell ist Atg26 sowie das SM-Protein Vps45. Fehlt das SNARE-Protein Tlg2 sind die Zellen stark im Wachstum gehemmt. Von den drei getesteten Einheiten des GARP (*Golgi-associated retrograde protein*)/VFT (*Vps Fifty-Three*) Komplex ist Vps52 essentiell, wohingegen *vps51Δ* und *vps53Δ* im Wachstum reduziert sind.

Trs65, neben Trs85 und Trs33 eine der drei nicht-essentiellen Untereinheiten des TRAPP II-Komplexes (Sacher *et al.*, 2001), ist für das Wachstum unter ER-Stress wichtig. Bisher konnte für Trs65 weder für Autophagie, noch für den Cvt-Weg eine Relevanz gezeigt werden.

Atg17 dient, analog zu Atg11 im Cvt-Weg, während der Autophagie als Gerüst für die Assemblierung der PAS (Suzuki *et al.*, 2007). Unter ER-Stress ist die Deletion von *ATG17* jedoch nicht lethal, führt aber zu einer starken Reduktion im Wachstum. Atg31 (Cis1) interagiert mit Atg17 und ist von Atg17-abhängig an der PAS lokalisiert. Dort könnten Atg17 und Atg31 mit Atg29 einen Komplex bilden, der andere Atg-Proteine an die PAS rekrutieren könnte (Kabeya *et al.*, 2007; Kawamata *et al.*, 2008). Während *atg29Δ*-Zellen wachstumsreduziert sind, ist die Deletion von *ATG31* lethal.

In Zellen ohne die Lipase Atg15 ist das Wachstum signifikant reduziert. Zudem ist die AAA-ATPase Vps4 für das Wachstum unter ER-Stress essentiell. Vps4 ist für den MVB-Weg wichtig, über den u.a. Atg15 zur Vakuole transportiert wird. Beide Befunde lassen darauf schließen, dass unter ER-Stress die Funktion von Atg15 benötigt wird.

Vam3 (Syntaxin Homolog) und Vam7 (SNAP-25 Homolog), die für die heterotypische Fusion von Autophagosomen bzw. Cvt-Vesikeln mit der Vakuole benötigt werden, sind weitere essentielle Proteine für das Überleben unter

ER-Stress. Dieses, und die benötigte Aktivität von Atg15, ist ein Indiz dafür, dass ein autophagischer Prozess durch ER-Stress induziert wird, der für das Überleben der Zellen wichtig ist.

Weiterhin sind die Proteine Vps27 und Vps28, beide Bestandteil des ESCRT-I Komplex, essentiell für das Wachstum unter ER-Stress. Vps27 bildet einen Komplex mit Hse1, der an Ubiquitin bindet und für die Sortierung von Proteinen am Endosom wichtig ist (Bilodeau *et al.*, 2002). Dass beide Proteine in diesem Versuch wichtig sind, könnte auch ein indirekter Effekt durch Schädigung des Endosoms sein.

5.5.2 Analyse des Abbaus von GFP-Atg8 in verschiedenen Deletionsstämmen unter ER-Stress

Der Abbau von GFP-Atg8 in der Studie von Yorimitsu *et al.* ist wahrscheinlich auf Makroautophagie zurückzuführen, da gezeigt werden konnte, dass auch proApe1 unter ER-Stress gereift wird (Yorimitsu *et al.*, 2006). Da die Menge gereifter Ape1 unter ER-Stress aber bedeutend geringer als unter Hungerung war, ist nicht auszuschließen, dass der Cvt-Weg für den Transport von proApe1 unter ER-Stress zuständig ist. Zudem ist es möglich, dass Autophagie induziert wird, aber geringe Aktivität aufweist, so dass der Abbau von GFP-Atg8 und Pgk1-GFP nicht nachweisbar ist.

Um den Widerspruch auszuräumen, ob GFP-Atg8 unter ER-Stress in der Vakuole abgebaut wird oder nicht, wurden mehrere Stämme auf den Abbau von GFP-Atg8 unter verschiedenen Bedingungen hin untersucht (Abbildung 4.23). Im Wildtyp BY4741 ist unter Wachstumsbedingungen und ER-Stress erst nach 24 Stunden freies GFP detektierbar. Da zu diesem Zeitpunkt Autophagie auf Grund von eintretendem Nährstoffmangel induziert sein sollte, könnte dies den Abbau von GFP-Atg8 erklären. In keinem der untersuchten Stämme ist unter ER-Stress ein Abbau vor dem 24h Wert zu erkennen. Dies unterstützt die Ergebnisse von Bernales *et al.* und steht somit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Yorimitsu *et al.* (Bernales *et al.*, 2006a; Yorimitsu *et al.*, 2006). ER-Stress induziert in dieser Arbeit folglich nicht Makroautophagie.

Zusätzlich wird GFP-Atg8 in den Stämmen *hac1Δ* und *ire1Δ* unter Hungerbedingungen viel stärker abgebaut als in den übrigen Stämmen. Das Fehlen der UPR, wie in *hac1Δ* und *ire1Δ*, scheint die Induktion der Autophagie unter Hungerbedingungen zu verstärken, um möglicherweise die fehlende UPR

auszugleichen. Nicht auszuschließen ist aber auch, dass das durch die fehlende UPR geschädigte ER indirekt der Auslöser ist.

5.5.3 Analyse des Pgk1-GFP-Abbaus in verschiedenen Deletionsstämmen unter ER-Stress

Die Untersuchung mit GFP-Atg8 lässt darauf schließen, dass ER-Stress nicht zur Induktion von Makroautophagie führt. Um dies zu untermauern wurde das Experiment mit Stämmen wiederholt, in die Pgk1-GFP transformiert war. Pgk1 ist ein zytosolisches Protein, das nur durch unspezifische Makroautophagie zur Vakuole transportiert wird. In diesem Versuch (Abbildung 4.24) zeigte sich ebenfalls, dass ER-Stress nicht zum vakuolären Abbau von Pgk1-GFP führt und somit Makroautophagie nicht induziert.

5.5.4 Analyse von Sec61-GFP als mögliches Markerprotein für ER-Phagie

Bisher konnte nur gezeigt werden, dass Autophagie-Gene für das Überleben unter ER-Stress relevant sind. Die Frage, ob es zum vakuolären Abbau von ER-Material durch selektive ER-Phagie kommt, ist jedoch nicht beantwortet. Um zu analysieren, ob ER-Phagie zum vakuolärem Abbau von ER-Bestandteilen führt, wurde ein ER-spezifisches Markerprotein zum Verfolgen des Abbaus gesucht.

Sec61 wurde bereits bei Bernales *et al.* in Form eines Fusionsproteins (Sec61-*cherry*) für fluoreszenzmikroskopische Studien zur ER-Proliferation genutzt. Dieses Protein ist essentieller Bestandteil des heterotrimeren Sec61-Komplexes (*Translocon*). Dieser Komplex sitzt an der Membran des ER und bildet dort einen Kanal, der für den Transport von Proteinen in das ER und von falsch gefalteten Proteinen aus dem ER benötigt wird (Übersicht siehe Osborne *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass chromosomal-kodiertes Sec61-GFP durch Inkubation mit TM oder DTT in höherem Maße in der Vakuole abgebaut wird als unter Hungerbedingungen (Abbildung 4.25).

Die erzeugte Plasmid-kodierte Variante Sec61-GFP lokalisierte im Fluoreszenzmikroskop wie die chromosomal integrierte Form (Abbildung 4.26). Die leichte Überexpression der Plasmid-Variante hatte daher keinen Einfluss auf

die Lokalisation. Sec61-GFP konnte folglich als spezifisches Markerprotein für den ER-Abbau genutzt werden.

Verschiedene Versuche mit Sec61-GFP (Abbildung 4.27 und 4.28 sowie nicht gezeigte Ergebnisse) zeigten unterschiedliche Ergebnisse. So war der Abbau von Sec61-GFP im Wildtyp BY4741 nicht immer zu sehen. Auch unter Hungerbedingungen war in einigen Experimenten der Abbau von Sec61-GFP zu sehen, in anderen nicht. Dies galt ebenso für den Abbau unter optimalen Wachstumsbedingungen.

Die Ergebnisse mit Plasmid-kodiertem Sec61-GFP sind unter den Versuchsbedingungen als nicht reproduzierbar zu werten. Ein Problem könnte die zusätzlich eingebrachte Kopie des *SEC61* in den Stämmen darstellen, da das chromosomale Gen noch vorhanden ist. Da Sec61 Bestandteil eines Komplexes ist, könnten überzählige Proteine die Komplexbildung stören. Weiterhin ist es möglich, dass der Versuch nicht optimal etabliert ist. Die Induktion von ER-Stress durch DTT könnte durch mangelnde Qualität der eingesetzten Chemikalie Schwankungen unterliegen. Dies würde allerdings nicht erklären, wieso unterschiedliche Befunde in den Bedingungen ohne ER-Stress beobachtet wurden.

Bisher konnte nicht geklärt werden, ob ER-Phagie zu einem spezifischen Abbauweg von ER-Bestandteilen führt, da kein geeignetes Markerprotein gefunden werden konnte. Ein solches Markerprotein zu finden wäre der nächste wichtige Schritt bei der Fortführung dieser Studie.

6 Literaturverzeichnis

Abeliovich, H., Dunn, W.A., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000). Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol* **151**, 1025-1034.

Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 189-207.

Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **139**, 1687-1695.

Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9.

Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**, 271-282.

Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* **3**, 283-289.

Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* **162**, 435-442.

Barrowman, J., Sacher, M., and Ferro-Novick, S. (2000). TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking. *EMBO J* **19**, 862-869.

Barth, H., Meiling-Wesse, K., Eppler, U.D., and Thumm, M. (2001). Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS Lett* **508**, 23-28.

Barth, H., Meiling-Wesse, K., Epple, U.D., and Thumm, M. (2002). Mai1p is essential for maturation of proaminopeptidase I but not for autophagy. *FEBS Lett* **512**, 173-179.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006a). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**, e423.

Bernales, S., Papa, F.R., and Walter, P. (2006b). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 487-508.

Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C., and Piper, R.C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* **4**, 534-539.

Bilodeau, P.S., Winistorfer, S.C., Kearney, W.R., Robertson, A.D., and Piper, R.C. (2003). Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J Cell Biol* **163**, 237-243.

Boehm, M., and Bonifacino, J.S. (2001). Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-2920.

Bonangelino, C.J., Nau, J.J., Duex, J.E., Brinkman, M., Wurmser, A.E., Gary, J.D., Emr, S.D., and Weisman, L.S. (2002). Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *J Cell Biol* **156**, 1015-1028.

Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.

Catlett, N.L., and Weisman, L.S. (2000). Divide and multiply: organelle partitioning in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 509-516.

Cheever, M.L., Sato, T.K., de Beer, T., Kutateladze, T.G., Emr, S.D., and Overduin, M. (2001). Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat Cell Biol* **3**, 613-618.

Cigan, A.M., Bushman, J.L., Boal, T.R., and Hinnebusch, A.G. (1993). A protein complex of translational regulators of GCN4 mRNA is the guanine nucleotide-exchange factor for translation initiation factor 2 in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5350-5354.

Clary, D.O., Griff, I.C., and Rothman, J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**, 709-721.

Cowles, C.R., Snyder, W.B., Burd, C.G., and Emr, S.D. (1997). Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J* **16**, 2769-2782.

Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**, 1197-1206.

Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404.

Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18773-18784.

Deloche, O., Yeung, B.G., Payne, G.S., and Schekman, R. (2001). Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* **12**, 475-485.

Dove, S.K., Cooke, F.T., Douglas, M.R., Sayers, L.G., Parker, P.J., and Michell, R.H. (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* **390**, 187-192.

Dove, S.K., Piper, R.C., McEwen, R.K., Yu, J.W., King, M.C., Hughes, D.C., Thuring, J., Holmes, A.B., Cooke, F.T., Michell, R.H., et al. (2004). Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *EMBO J* **23**, 1922-1933.

Dunn, W.A., Cregg, J.M., Kiel, J.A., van der Klei, I.J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A.A., Stasyk, O.V., and Veenhuis, M. (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy* **1**, 75-83.

Efe, J.A., Botelho, R.J., and Emr, S.D. (2007). Atg18 regulates organelle morphology and Fab1 kinase activity independent of its membrane recruitment by phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. *Mol Biol Cell* **18**, 4232-4244.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191.

Epple, U.D., Eskelinen, E.L., and Thumm, M. (2003). Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *J Biol Chem* **278**, 7810-7821.

Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L., and Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a Putative Lipase Essential for Disintegration of Autophagic Bodies inside the Vacuole. *J Bacteriol* **183**, 5942-5955.

Farre, J.C., and Subramani, S. (2004). Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol* **14**, 515-523.

Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15781-15786.

- Fratti, R.A., Jun, Y., Merz, A.J., Margolis, N., and Wickner, W.** (2004). Interdependent assembly of specific regulatory lipids and membrane fusion proteins into the vertex ring domain of docked vacuoles. *J Cell Biol* **167**, 1087-1098.
- Fricke, J., Voss, C., Thumm, M., and Meyers, G.** (2004). Processing of a pestivirus protein by a cellular protease specific for light chain 3 of microtubule-associated proteins. *J Virol* **78**, 5900-5912.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T.** (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 379-384.
- George, R., Beddoe, T., Landl, K., and Lithgow, T.** (1998). The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2296-2301.
- Glick, B.S., and Rothman, J.E.** (1987). Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* **326**, 309-312.
- Gozuacik, D., and Kimchi, A.** (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891-2906.
- Griff, I.C., Schekman, R., Rothman, J.E., and Kaiser, C.A.** (1992). The yeast SEC17 gene product is functionally equivalent to mammalian alpha-SNAP protein. *J Biol Chem* **267**, 12106-12115.
- Guan, J., Stromhaug, P.E., George, M.D., Habibzadegah-Tari, P., Bevan, A., Dunn, W.A., and Klionsky, D.J.** (2001). Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* **12**, 3821-3838.
- Guthrie, C., and Fink, G.R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* **194**, 1-863.

- Hanahan, D., and Meselson, M.** (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**, 333-342.
- Harding, T., Hefner-Gravink, A., Thumm, M., and Klionsky, D.** (1996). Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Biol Chem* **271**, 17621-17624.
- Hashimoto, C., Cohen, R.E., Zhang, W.J., and Ballou, C.E.** (1981). Carbohydrate chains on yeast carboxypeptidase Y are phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2244-2248.
- Hasilik, A., and Tanner, W.** (1978). Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into the enzyme. *Eur J Biochem* **85**, 599-608.
- He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrskaya, I., Yen, W.L., Legakis, J.E., and Klionsky, D.J.** (2006). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J Cell Biol* **175**, 925-935.
- Hengartner, C.J., Thompson, C.M., Zhang, J., Chao, D.M., Liao, S.M., Koleske, A.J., Okamura, S., and Young, R.A.** (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev* **9**, 897-910.
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B.** (2007). Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**, 29-45.
- Horazdovsky, B.F., Busch, G.R., and Emr, S.D.** (1994). VPS21 encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins. *EMBO J* **13**, 1297-1309.
- Huang, J., and Klionsky, D.J.** (2007). Autophagy and human disease. *Cell Cycle* **6**, 1837-1849.

Huang, W.P., Scott, S.V., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000). The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *J Biol Chem* **275**, 5845-5851.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691.

Hurley, J.H., and Emr, S.D. (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277-298.

Hutchins, M.U., and Klionsky, D.J. (2001). Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 20491-20498.

Hutchins, M.U., Veenhuis, M., and Klionsky, D.J. (1999). Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci* **112**, 4079-4087.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492.

Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). Autophagosome Requires Specific Early Sec Proteins for Its Formation and NSF/SNARE for Vacuolar Fusion. *Mol Biol Cell* **12**, 3690-3702.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-4574.

Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643.

Jin, S. (2006). Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy* **2**, 80-84.

Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10340-10344.

Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol* **4**, e36.

Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., and Ohsumi, Y. (2005). Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell* **16**, 2544-2553.

Kabeya, Y., Kawamata, T., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2007). Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 405-410.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**, 1507-1513.

Kanki, T., and Klionsky, D.J. (2008). Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism. *J Biol Chem* **283**, 32386-32393.

Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy* **3**, 610-613.

Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-155.

Katzmann, D.J., Sarkar, S., Chu, T., Audhya, A., and Emr, S.D. (2004). Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Mol Biol Cell* **15**, 468-480.

Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* **162**, 413-423.

Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2008). Organization of the Pre-autophagosomal Structure Responsible for Autophagosome Formation. *Mol Biol Cell* **19**, 2039-2050.

Kaytor, M.D., and Livingston, D.M. (1995). GSG1, a yeast gene required for sporulation. *Yeast* **11**, 1147-1155.

Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes Function in Autophagy and Carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **152**, 519-530.

Kim, J., Dalton, V.M., Eggerton, K.P., Scott, S.V., and Klionsky, D.J. (1999). Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol Biol Cell* **10**, 1337-1351.

Kim, J., Scott, S.V., Oda, M.N., and Klionsky, D.J. (1997). Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* **137**, 609-618.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147**, 435-446.

- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**, 263-276.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., and Camougrand, N.** (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 39068-39074.
- Kissova, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., and Camougrand, N.** (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* **3**, 329-336.
- Klionsky, D.J.** (1998). Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. *J Biol Chem* **273**, 10807-10810.
- Klionsky, D.J.** (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* **118**, 7-18.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al.** (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**, 539-545.
- Klionsky, D.J., Cueva, R., and Yaver, D.S.** (1992). Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol* **119**, 287-299.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D.** (1989). Membrane protein sorting: biosynthesis, transport and processing of yeast vacuolar alkaline phosphatase. *EMBO J* **8**, 2241-2250.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D.** (1990). A new class of lysosomal/vacuolar protein sorting signals. *J Biol Chem* **265**, 5349-5352.

Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 1-32.

Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* **22**, 2309-2317.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* **10**, 602-610.

Krick, R., Henke, S., Tolstrup, J., and Thumm, M. (2008a). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy* **4**.

Krick, R., Muehe, Y., Prick, T., Bremer, S., Schlotterhose, P., Eskelinen, E.L., Millen, J.I., Goldfarb, D.S., and Thumm, M. (2008b). Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Mol Biol Cell* **19**, 4492-4505.

Krick, R., Tolstrup, J., Appelles, A., Henke, S., and Thumm, M. (2006). The relevance of the phosphatidylinositolphosphat-binding motif FRRGT of Atg18 and Atg21 for the Cvt pathway and autophagy. *FEBS Lett* **580**, 4632-4638.

Kruse, K.B., Brodsky, J.L., and McCracken, A.A. (2006). Autophagy: an ER protein quality control process. *Autophagy* **2**, 135-137.

Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**, 18619-18625.

Kvam, E., and Goldfarb, D.S. (2007). Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*. *Autophagy* **3**, 85-92.

Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M., and Thumm, M. (2000). Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *J Bacteriol* **182**, 2125-2133.

Leber, R., Silles, E., Sandoval, I.V., and Mazon, M.J. (2001). Yol082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J Biol Chem* **276**, 29210-29217.

Lerena, C., Calligaris, S.D., and Colombo, M.I. (2008). Autophagy: for better or for worse, in good times or in bad times. *Curr Mol Med* **8**, 92-101.

Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-477.

Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* **16**, 87-93.

Massey, A., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2420-2434.

Mayer, A., Wickner, W., and Haas, A. (1996). Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* **85**, 83-94.

McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (2005). Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival. *Curr Top Microbiol Immunol* **300**, 17-40.

Meiling-Wesse, K., Barth, H., Voss, C., Eskelinen, E.L., Epple, U.D., and Thumm, M. (2004). Atg21 is required for effective recruitment of Atg8 to the preautophagosomal structure during the Cvt pathway. *J Biol Chem* **279**, 37741-37750.

- Meiling-Wesse, K., Epple, U.D., Krick, R., Barth, H., Appelles, A., Voss, C., Eskelinen, E.L., and Thumm, M.** (2005). 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* **280**, 33669-33678.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T.** (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-772.
- Misra, S., and Hurley, J.H.** (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* **97**, 657-666.
- Mizushima, N.** (2007). Collaboration of proteolytic systems. *Autophagy* **3**, 179-180.
- Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C., and Botstein, D.** (1982). Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**, 547-563.
- Monastyrska, I., Sjollem, K., Van Der Klei, I.J., Kiel, J.A., and Veenhuis, M.** (2004). Microautophagy and macropexophagy may occur simultaneously in *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett* **568**, 135-138.
- Monastyrska, I., and Klionsky, D.J.** (2006). Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol Aspects Med* **27**, 483-494.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., and Yura, T.** (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* **1**, 803-817.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., and Sambrook, J.** (1993). A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* **74**, 743-756.

Mukaiyama, H., Oku, M., Baba, M., Samizo, T., Hammond, A.T., Glick, B.S., Kato, N., and Sakai, Y. (2002). Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. *Genes Cells* **7**, 75-90.

Muller, O., Sattler, T., Flotenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., and Mayer, A. (2000). Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J Cell Biol* **151**, 519-528.

Nasmyth, K.A., and Reed, S.I. (1980a). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 2119-2123.

Nasmyth, K.A., and Reed, S.I. (1980b). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2119-2123.

Nice, D.C., Sato, T.K., Stromhaug, P.E., Emr, S.D., and Klionsky, D.J. (2002). 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* **277**, 30198-30207.

Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* **148**, 465-480.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* **273**, 3963-3966.

Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y. (2008). The ATG18-ATG2 complex is recruited to autophagic membranes via PtdIns(3)P and exerts an essential function. *J Biol Chem*.

Oda, M., Scott, S., Hefner-Gravink, A., Caffarelli, A., and Klionsky, D. (1996). Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *JCellBiol* **132**, 999-1010.

Oku, M., Warnecke, D., Noda, T., Muller, F., Heinz, E., Mukaiyama, H., Kato, N., and Sakai, Y. (2003). Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *EMBO J* **22**, 3231-3241.

Orvedahl, A., and Levine, B. (2009). Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* **16**, 57-69.

Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 529-550.

Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., Kvam, E., Shulga, N., Huang, K., Lemmon, S., and Goldfarb, D.S. (2000). Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell* **11**, 2445-2457.

Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B.A., Lopez-Buesa, P., Walter, W.A., Wiedmann, M., and Craig, E.A. (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J* **17**, 3981-3989.

Piper, R.C., Bryant, N.J., and Stevens, T.H. (1997). The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol* **138**, 531-545.

Prag, G., Watson, H., Kim, Y.C., Beach, B.M., Ghirlando, R., Hummer, G., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2007). The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev Cell* **12**, 973-986.

Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., and Nordheim, A. (2004). 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* **23**, 9314-9325.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* **1**, 11-21.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2005). Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* **17**, 415-422.

Reggiori, F., Monastyrska, I., Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2005a). The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**, 5843-5856.

Reggiori, F., and Pelham, H.R. (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J* **20**, 5176-5186.

Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2005b). Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* **1**, 101-109.

Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2004). The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* **6**, 79-90.

- Reggiori, F., Wang, C.W., Stromhaug, P.E., Shintani, T., and Klionsky, D.J.** (2003). Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. *J Biol Chem* **278**, 5009-5020.
- Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S., and Wiedmann, B.** (1999). Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* **15**, 397-407.
- Rizo, J., and Sudhof, T.C.** (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* **3**, 641-653.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D.S.** (2003). Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 129-141.
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M., and Emr, S.D.** (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **8**, 4936-4948.
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.P., Brech, A., Bilder, D., *et al.*** (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* **17**, 1817-1825.
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., and Ferro-Novick, S.** (2001). TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol Cell* **7**, 433-442.
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J., and Kiel, J.A.** (2006). Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1767-1775.
- Sakai, Y., and Subramani, S.** (2000). Environmental response of yeast peroxisomes. Aspects of organelle assembly and degradation. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**, 51-61.

Saksena, S., Sun, J., Chu, T., and Emr, S.D. (2007). ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* **32**, 561-573.

Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S., and Munz, C. (2006). Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* **84**, 194-202.

Scott, S., Hefner-Gravink, A., Morano, K., Noda, T., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. (1996). Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proceed Nat Acad Sci USA* **93**, 12304-12308.

Scott, S.V., Guan, J., Hutchins, M.U., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2001). Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* **7**, 1131-1141.

Scott, S.V., Nice, D.C., Nau, J.J., Weisman, L.S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000). Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J Biol Chem* **275**, 25840-25849.

Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T., and Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9402-9407.

Shacka, J.J., Roth, K.A., and Zhang, J. (2008). The autophagy-lysosomal degradation pathway: role in neurodegenerative disease and therapy. *Front Biosci* **13**, 718-736.

Shi, X., Parthun, M.R., and Jaehning, J.A. (1995). The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the alpha NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* **165**, 199-202.

- Shintani, T., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J.** (2002). Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell* **3**, 825-837.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., and Stenmark, H.** (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem* **280**, 19600-19606.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J.** (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**, 181-185.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.
- Sorensen, S., van den Hazel, H., Kielland-Brandt, M., and Winther, J.** (1994). pH-dependent processing of yeast procarboxypeptidase Y by proteinase A *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Biochem* **220**, 19-27.
- Stagljar, I., and Fields, S.** (2002). Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends Biochem Sci* **27**, 559-563.
- Stahelin, R.V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K.S., Murray, D., and Cho, W.** (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem* **277**, 26379-26388.
- Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J.** (2001). Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic* **2**, 524-531.

Stromhaug, P.E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C.W., and Klionsky, D.J. (2004). 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* **15**, 3553-3566.

Stroupe, C., Collins, K.M., Fratti, R.A., and Wickner, W. (2006). Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *EMBO J* **25**, 1579-1589.

Suriapranata, I., Epple, U.D., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Sovarasteanu, K., and Thumm, M. (2000). The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J Cell Sci* **113**, 4025-4033.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* **20**, 5971-5981.

Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**, 209-218.

Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* **119**, 301-311.

Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionsky, D.J., and Abeliovich, H. (2007). Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J Biol Chem* **282**, 5617-5624.

- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E.** (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* **10**, 1367-1379.
- Tannous, P., Zhu, H., Johnstone, J.L., Shelton, J.M., Rajasekaran, N.S., Benjamin, I.J., Nguyen, L., Gerard, R.D., Levine, B., Rothermel, B.A., et al.** (2008). Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9745-9750.
- Teo, H., Veprintsev, D.B., and Williams, R.L.** (2004). Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **279**, 28689-28696.
- Terman, A., and Brunk, U.T.** (2005). Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc Res* **68**, 355-365.
- Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., and Klionsky, D.J.** (2001). Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* **276**, 2083-2087.
- Ungermann, C., and Langosch, D.** (2005). Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* **118**, 3819-3828.
- Valls, L.A., Winther, J.R., and Stevens, T.H.** (1990). Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J Cell Biol* **111**, 361-368.
- van Anken, E., and Braakman, I.** (2005). Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 191-228.
- Vellai, T.** (2009). Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ* **16**, 94-102.

- Wang, C.W., Kim, J., Huang, W.P., Abeliovich, H., Stromhaug, P.E., Dunn, W.A., and Klionsky, D.J.** (2001). Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J Biol Chem* **276**, 30442-30451.
- Wang, L., Merz, A.J., Collins, K.M., and Wickner, W.** (2003). Hierarchy of protein assembly at the vertex ring domain for yeast vacuole docking and fusion. *J Cell Biol* **160**, 365-374.
- Weisman, L.S.** (2003). Yeast vacuole inheritance and dynamics. *Annu Rev Genet* **37**, 435-460.
- Weisman, L.S.** (2006). Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 243-252.
- Wickner, W., and Haas, A.** (2000). Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms. *Annu Rev Biochem* **69**, 247-275.
- Wickner, W., and Schekman, R.** (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**, 1452-1456.
- Wickner, W., and Schekman, R.** (2008). Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 658-664.
- Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Kuang, W.J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A., and Rothman, J.E.** (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* **339**, 355-359.
- Yamamoto, A., De, W.D., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., Emr, S.D., and Koshland, D.** (1995). Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell* **6**, 525-539.
- Yen, W.L., Legakis, J.E., Nair, U., and Klionsky, D.J.** (2007). Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol Biol Cell* **18**, 581-593.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005a). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell* **16**, 1593-1605.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005b). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1542-1552.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* **281**, 30299-30304.

Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4952-4957.

7 Veröffentlichungen

- 2006** Krick, R., **Tolstrup, J.**, Appelles, A., Henke, S., and Thumm, M. (2006). The relevance of the phosphatidylinositolphosphat-binding motif FRRGT of Atg18 and Atg21 for the Cvt pathway and autophagy. *FEBS Lett* 580, 4632-4638.
- 2008** Krick, R., Henke, S., **Tolstrup, J.**, and Thumm, M. (2008). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy* 4, 896-910.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Thumm für die Überlassung des interessanten Themas, der immer gewährten Unterstützung und den zahlreichen Diskussionen und Anregungen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. von Figura für die Übernahme des Referates und Herrn Prof. Dr. Feußner für die Übernahme des Koreferates vielmals danken.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. Roswitha Krick für die Betreuung meines Themas, den vielen kritischen Anregungen, hilfreichen Tipps bei experimentellen und theoretischen Problemen sowie für die zahlreichen Stunden die sie mit der Durchsicht dieser Arbeit verbracht hat.

Nicole Eiselt und Dr. Bernhard Schmidt danke ich sehr für die Durchführung der massenspektroskopischen Analysen sowie den Tipps bei der Auswertung der Ergebnisse.

Besonders danken möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Kollegen der Arbeitsgruppe Thumm. Fotini, Rosi, Sandra und Sebastian für die Hilfsbereitschaft sowie für die vielen angenehmen Diskussionen. Anika, Evelyn, Tanja, Yvonne und Petra danke ich für die Unterstützung, Hilfestellungen und den zahlreichen Gesprächen. Vielen Dank für das freundschaftliche Miteinander im und außerhalb des Labors.

Danken möchte ich allen Angehörigen des Instituts für Biochemie II, besonders Jenny und Tanja, für viele Diskussionen und das angenehme Betriebsklima.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jörn Tolstrup
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum und -Ort: 25.11.1975 in Cagliari/Italien
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982 - 1985 Grundschole Holtenau in Kiel
1985 - 1986 Grundschole in Heiligenhafen
1986 - 1992 Realschole Heiligenhafen
1992 - 1993 Fachgymnasium (Technik) in Oldenburg i. H.
1993 - 1994 Waubay High School in Waubay, South Dakota, USA
1994 - 1996 Fachgymnasium (Technik) in Oldenburg i. H.
Abschluss Abitur

Grundwehrdienst

1996 – 1997 Grundwehrdienst bei der Deutschen Marine

Studium

1997 - 1998 Studium der Informatik Fachrichtung „Technische Informatik“ an der Fachhochschule Wedel
1998 - 1999 Studium der Physik an der Universität Hamburg
1999 - 2001 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
2001 Vordiplom, Note „gut“
2001 - 2004 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius Maximilians-Universität Würzburg
2003 Diplomprüfungen in den Fächern Genetik, Biochemie und Mikrobiologie, Note „sehr gut“
2003 - 2004 Externe Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg
2004 Abschluss Diplom, Note „sehr gut“

Promotion

2005 – 2009 Promotion im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität zu Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. Thumm