

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen,
Abteilung: Immunologie
Direktor: Professor Dr. Hans-Georg Rammensee

und dem

Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft,
Arbeitsgruppe Dr. Andreas Mayer

Pharmakologische und kinetische Analyse der Mikroautophagocytose *in vitro*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Joachim Bernd Kunz
aus
Karlsruhe

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: Dr. A. Mayer

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1. Transport in die Hefevakuole	5
1.2. Mikroautophagocytose	6
1.3. Zur Mikroautophagocytose analoge Prozesse	8
1.4. Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Ausstattung	13
2.1.2. Einmalartikel	14
2.1.3. Reagenzien	14
2.1.4. Primer	18
2.1.5. Hefestämme	18
2.1.6. Bakterienstämme	19
2.1.7. Antikörper	20
2.2. Methoden	20
2.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.2.2. Proteinbestimmung mittels BCA	21
2.2.3. Hefekultur	21
2.2.4. Vakuolenpräparation	21
2.2.5. Cytosolpräparation	23
2.2.6. Messung der Aktivität Alkalischer Phosphatase	23
2.2.7. Messung von Luciferaseaktivität	23
2.2.8. Messung von Meerrettichperoxidaseaktivität	24
2.2.9. Messung von Thrombinaktivität	24
2.2.10. Messung der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	24
2.2.11. TCA-Fällung	25
2.2.12. Proteinextrakt aus ganzen Hefezellen (Rödel-Aufschluß)	26
2.2.13. SDS-PAGE	26
2.2.14. Western Blot	27
2.2.15. Coomassie-Färbung	28
2.2.16. Immunfluoreszenzmikroskopie	28
2.2.17. Reinigung von antiVtc4p für Immunfluoreszenz	29
2.2.18. Elektronenmikroskopie	29
2.2.19. Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe	30
2.2.20. PCR	30
2.2.21. Klonierung	31
2.2.22. Plasmidpräparation	31
2.2.23. Expression von Fusionsproteinen	32
2.2.24. Reinigung von löslichen His ₆ -Tag-Fusionsproteinen	32
2.2.25. Reinigung von His ₆ -Tag-Fusionsproteinen aus Einschlußkörperchen	33
2.2.26. Reinigung von GST-Fusionsproteinen	34
2.2.27. Kopplung von Proteinen an aktivierte CH-Sepharose	34
2.2.28. Immunisierung von Kaninchen, Blutentnahme	35
2.2.29. Affinitätsreinigung von Antikörpern	35
3. Ergebnisse	36
3.1. Niedermolekulare Inhibitoren der <i>in vitro</i> -Mikroautophagocytose	36

3.2. Kinetische Analyse der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	42
3.3. Rolle von Actin in der Mikroautophagocytose	55
3.4. Suche nach hemmenden Antikörpern	63
4. Diskussion	66
4.1. Aufteilung der <i>in vitro</i> -Mikroautophagocytose in vier Stadien	66
4.2. Die Rolle von Actin in der Mikroautophagocytose	73
4.3. Die Rolle von Aut- und Apg-Proteinen für die Mikroautophagocytose	74
4.4. Physiologische Funktion der Mikroautophagocytose	76
4.5. Medizinische Bedeutung eines Systems zur Messung der Mikroautophagocytose <i>in vitro</i>	77
5. Zusammenfassung	79
6. Literatur	80

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1. Mikroautophagocytose und verwandte Prozesse	
Abb. 2. Titration verschiedener Hemmstoffe der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	
Abb. 3. Einstülpungen der Vakuolenmembran entstehen unabhängig von den vom Spindelpolkörper ausgehenden Mikrotubuli.	
Abb. 4. Abhängigkeit der Hemmstoffwirkung von Cytosol	
Abb. 5. Kinetiken der Hemmung der <i>in vitro</i> -Autophagocytose durch verschiedene Hemmstoffe	
Abb. 6. Reversibilität der Wirkung von Hemmstoffen	
Abb. 7. Wirkung von Hemmstoffen nach reversibler Blockade	
Abb. 8. „Schnelle“ Aufnahme nach Vorinkubation der Vakuolen	
Abb. 9. Die „schnelle“ Aufnahme ist unabhängig von der Vakuolenkonzentration.	
Abb. 10. Abhängigkeit der „schnellen Aufnahme“ von Hemmstoffen	
Abb. 11. Abhängigkeit der „schnellen Aufnahme“ vom Medium	
Abb. 12. Schnell aufgenommene Luciferase läßt sich nicht von der über 60 min aufgenommenen Luciferase unterscheiden.	
Abb. 13. Titration verschiedener Actinhemmstoffe	
Abb. 14. Einfluß von Cofilin und Twinfilin auf die <i>in vitro</i> -Autophagocytose	
Abb. 15. Bindung von Actin an die Vakuolen während der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	
Abb. 16. Färbung von Vakuolen mit antiVtc4p	
Abb. 17. Lokalisierung von Actin an der Vakuole	
Abb. 18. Immunogold-Markierung von Actin an gehungerten Hefezellen	
Abb. 19. Reinigung von Aut- und Apg-Proteinen	
Abb. 20. Nachweis von Aut- und Apg-Proteinen im Western Blot	
Abb. 21. Titration von Antikörpern in der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	
Tab. 1. Hemmstoffe der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	
Tab. 2. Stoffe, über die keine sichere Aussage bezüglich des Einflusses auf die <i>in vitro</i> - Autophagocytose möglich ist.	
Tab. 3. Stoffe, die keine Hemmung der <i>in vitro</i> -Autophagocytose bewirken	
Tab. 4. Stadien der <i>in vitro</i> -Autophagocytose	

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APG	„autophagy“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUT	„autophagocytosis“
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
cps	„counts per second“
CVT	„cytoplasm to vacuole targeting“
DEAE	Diethylaminoethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTAF	5-[(4,6-Dichlortriazin-2-yl)amino]-fluorescein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„epidermal growth factor“
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon
FKBP	„FK506 binding protein“
GSA	„glucose-induced selective autophagy“
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	„horseradish peroxidase“
IC50 bzw. 90	Konzentration bei 50% bzw. 90% Hemmung
IGF	„insulin-like growth factor“
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LB	Luria-Bertani
LDL	„low density lipoprotein“
MHC	„major histocompatibility complex“
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MVB	„multivesicular body“
NSF	„N-ethylmaleimid sensitive fusion factor“
NTA	Nitrilotriacetat
OD _{600/405}	optische Dichte bei 600 nm bzw. 405 nm
PAG	„peroxisome microautophagy“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNARE	„soluble NSF attachment protein receptor“
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TOR	„target of rapamycin“
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	ultraviolett
YP	„yeast/pepton“
YPD	„yeast/pepton/dextrose“

1. Einleitung

1.1. Transport in die Hefevakuole

Typisches Merkmal eukaryontischer Zellen ist ihre Kompartimentierung. In von Membranen umhüllten Organellen können verschiedene chemische Reaktionen gleichzeitig, aber räumlich getrennt ablaufen. Eines dieser Organellen ist das Lysosom, dem die Vakuole der Hefezelle entspricht. Es beinhaltet zahlreiche Hydrolasen und ist eines der wichtigsten lysischen Kompartimente der Zelle (Wiemken et al., 1979).

Die Hefevakuole wird auf mehreren Wegen mit Proteinen beliefert (Scott und Klionsky, 1998). Vakuoläre Enzyme können auf dem sekretorischen Weg über Endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat in die Vakuole gebracht werden. Typische Substrate für diesen Weg sind Alkalische Phosphatase, Carboxypeptidase Y und Carboxypeptidase S. Alternativ werden vakuoläre Hydrolasen auch cytoplasmatisch synthetisiert. Nachdem sie sich zu größeren Aggregaten zusammengelagert haben, werden sie von Membranen umschlossen, die mit der Vakuole fusionieren und ihren Inhalt ins Vakuolenlumen freisetzen. Als Markerenzym für diesen Cytoplasma-zu-Vakuole- (Cvt-) Weg dient Aminopeptidase I.

Der Eintransport von zum Abbau bestimmten Substraten in die Vakuole überlappt sich nur zum Teil mit den Transportwegen für vakuoläre Enzyme. Substrate von außerhalb der Zelle können über Endocytose und Fusion der gereiften Endosomen mit der Vakuole abgebaut werden. Auch Plasmaproteine wie der Pheromonrezeptor Ste2p können auf diesem Weg abgebaut werden (Odorizzi et al., 1998). Einige cytosolische Proteine können spezifisch über einen Transporter in das Lysosom aufgenommen werden (Cuervo und Dice, 1996). Wird Cytoplasma in die Vakuole aufgenommen, so spricht man von Autophagocytose. Dabei unterscheidet man Makro- und Mikroautophagocytose (Dunn, 1994). Bei der Makroautophagocytose wird, ähnlich wie beim Cvt-Weg, Cytoplasma von Membranen umhüllt. Dadurch entstehen von Doppelmembranen begrenzte Autophagosomen (Baba et al., 1994 und 1995), deren äußere Membran mit der Vakuolenmembran fusioniert und so das eingeschlossene Cytoplasma dem Abbau preisgibt. Dieser Prozeß wird in Hefe unter anderem durch Stickstoffmangel induziert und führt im Falle von proteasedefizienten Stämmen zur Anhäufung autophagischer Körperchen innerhalb der Vakuole. Nicht nur lösliche Proteine, auch ganze Zellorganellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen können auf diesem Weg abgebaut werden (Sakai et al., 1998). Mittels genetischer und biochemischer Methoden

konnte eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die für die Makroautophagocytose benötigt werden, ohne daß deren Zusammenspiel im Detail geklärt werden konnte (Klionsky und Emr, 2000). Mutationen in diesen AUT- und APG-Genen verhindern die Akkumulation von autophagischen Körperchen in der Hefevakuole, wie sie bei proteasedefizienten Stämmen unter Hungerbedingungen beobachtet wird. Einige dieser Apg-Proteine sind Teil einer durch Rapamycin induzierbaren Kinasekaskade (Noda und Ohsumi, 1998), andere bilden ein Proteinkonjugationssystem ähnlich dem Ubiquitinsystem (Mizushima et al., 1998).

Autophagocytose ist an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt: Während der Differenzierung von Geweben können Zellen nicht mehr benötigte Organellen durch Autophagocytose abbauen (Takano-Ohmuro et al., 2000), der autophagische Zelltod ist eine Alternative zur Apoptose (Bursch et al., 2000; Bursch, 2001), Mutationen in autophagocytosespezifischen Proteinen können zur malignen Transformation von Tumorzellen beitragen (Liang et al., 1999), Defekte in der Autophagosomenreifung sind Ursache einer kardiomyopathischen Speicherkrankheit (Nishino et al., 2000; Tanaka et al., 2000), neurodegenerative Krankheiten wie die Parkinson'sche Krankheit (Anglade et al., 1997) oder spongiforme Enzephalopathien (Jeffrey et al., 1992) weisen ultrastrukturell eine verstärkte Autophagocytose auf. Der Mechanismus der Autophagocytose könnte den Schlüssel zum Verständnis einiger dieser Prozesse darstellen.

1.2. Mikroautophagocytose

Bei dem makroautophagocytotischen Weg des Transportes von Proteinen in die Vakuole werden zunächst im Cytoplasma Autophagosomen gebildet, die dann mit der Vakuole fusionieren (Abb. 1 c). Alternativ dazu kann sich aber auch die Vakuolenmembran direkt einstülpen und Cytoplasma umschließen, man spricht dann von Mikroautophagocytose (Abb. 1 a). Auch hierbei entstehen intravakuoläre Vesikel, die hydrolytisch verdaut werden; der Prozeß der Einstülpung der Vakuolenmembran kann als analog zur makroautophagocytotischen Umhüllung von Cytoplasmateilen gesehen werden.

Morphologisch wurde dieser Prozeß schon früh beschrieben (Fedorko et al., 1968; Hirsch et al., 1968), mechanistisch ist über ihn wenig bekannt. Mikroautophagocytose in Leberzellen wird unter Hungerbedingungen induziert, wird aber unabhängig von der Makroautophagocytose reguliert (Mortimore et al., 1983; de Waal et al., 1986).

Als Modellsystem dient unter anderem der Abbau von Peroxisomen in der Hefe *Pichia pastoris* nach Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol zu Glucose (Abb. 1 b). Unter diesen Bedingungen werden die Peroxisomen rasch durch direkte Aufnahme in die Vakuole abgebaut, was sich mikroskopisch leicht verfolgen läßt. Die Mikroautophagocytose dient hier also dem gezielten Abbau von Zellorganellen und stellt eine Alternative zur Makroautophagocytose dar. Von dieser ist sie unabhängig und wird auch entgegengesetzt reguliert: Beim Wechsel der Kohlenstoffquelle von Methanol auf Ethanol werden die Peroxisomen durch Makro- statt durch Mikroautophagocytose abgebaut. Die Mikroautophagocytose *in vivo* läßt sich in *Pichia pastoris* durch PMSF, Wortmannin und Cycloheximid hemmen, des weiteren wurden mehrere Mutationen (*gsa*, *pag*) isoliert, die die Mikroautophagocytose von Peroxisomen auf definierten Stufen blockieren (Sakai et al., 1998).

Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein mikroautophagischer Abbauweg von Fructose-1,6-bisphosphatase und Peroxisomen nach dem Wechsel der Kohlenstoffquelle von Oleat auf Glucose vorgeschlagen (Chiang et al., 1996). Morphologisch wurden Einstülpungen der Vakuolenmembran beschrieben, die durch Hunger induziert werden und deren Bildung in AUT- und APG-Mutanten reduziert ist (Müller et al., 2000). Diese Autophagischen Schläuche zeigen im elektronenmikroskopischen Bild von Gefrierbrüchen eine heterogene Verteilung großer Proteinkomplexe: Während an der Basis der Schläuche die Membran ultrastrukturell der Vakuolenmembran ähnelt und zahlreiche Membranproteine erkennen läßt, nimmt die Dichte von Membranproteinen zur Spitze der Schläuche hin ab. An der Spitze der Schläuche schnüren sich cytoplasmagefüllte autophagische Körperchen ab, deren Membran keine im Elektronenmikroskop erkennbaren Proteinkomplexe enthält. Diese auffällige Morphologie der Autophagischen Schläuche legt nahe, daß sie nicht nur einer Aufnahme von Cytoplasma in die Vakuole dienen, sondern daß gleichzeitig auch eine laterale Sortierung von Proteinen innerhalb der Membran stattfindet. Möglicherweise wird über die selektive Aufnahme bestimmter Membranfraktionen in die Vakuole die Größe und Zusammensetzung der Vakuolenmembran reguliert.

Die Einstülpung der Vakuolenmembran mit anschließender Abschnürung von Autophagischen Körperchen konnte *in vitro* mit isolierten Vakuolen rekonstituiert werden (Sattler und Mayer, 2000). Vakuolen nehmen, in Abhängigkeit von ATP, Cytosol, Salzen, Temperatur und pH, *in vitro* Anteile des umgebenden Mediums auf. Das kann durch

fluoreszenzmarkiertes Dextran sichtbar und durch Luciferase als Markerenzym meßbar gemacht werden. Diese Aufnahmereaktion erwies sich als unabhängig von bekannten Faktoren der Membranfusion wie Sec18p, Sec17p, Ypt7p, Vam3p, Vam7p oder Nyv1p. Durch die Verwendung von Cytosol aus gehungerten Zellen konnte die Effizienz der Aufnahme verdoppelt werden. Diese Steigerung der Aufnahmeeffizienz gelang allerdings nicht, wenn Cytosol aus AUT- oder APG-Mutanten verwendet wurde. Mikroautophagocytose kann also *in vitro* mit Vakuolen aus *Saccharomyces cerevisiae* rekonstituiert werden und ist so einer quantitativen Analyse zugänglich. Dieses Meßsystem kann nicht nur als Modell für Mikroautophagocytose im allgemeinen gelten, auch zahlreiche andere Transport- und Sortierungsprozesse in eukaryotischen Zellen entsprechen zumindest topologisch der Invagination und Abschnürung von Membranen ins Innere von Organellen.

1.3. Zur Mikroautophagocytose analoge Prozesse

Charakteristikum der Mikroautophagocytose ist die Bildung von Vesikeln auf der luminalen Seite des Lysosoms. Im Gegensatz zum Knospen von Vesikeln an der Plasmamembran, wie es bei der Endocytose vorkommt und wofür zahlreiche cytoplasmatische Faktoren nötig sind (Schmidt et al., 1999), ist das entstehende Vesikel zwar mit Cytoplasma angefüllt, aber von der unorganisierten, proteinarmeren Matrix des Vakuolenlumens umgeben. Die Topologie der Membran verhält sich somit bei der Mikroautophagocytose genau umgekehrt zu der der Endocytose.

Auf die Analogie zwischen Makroautophagocytose und Mikroautophagocytose bezüglich der Umhüllung von Teilen des Cytoplasmas wurde schon hingewiesen. Die äußere Membran des sich schließenden Autophagosoms entspricht dabei der Vakuolenmembran, die innere Membran dem Autophagischen Schlauch. Ähnlich wie bei der Makroautophagocytose bilden sich auch bei der Sporulation in Hefe neue intrazelluläre Membranen. Diese Membranen gehen von den vier Spindelpolkkörpern der Meiose II aus und umhüllen den zum jeweiligen Spindelpolkörper gehörigen Teil des Nukleus mit seinem haploiden Chromosomensatz. Durch das Schließen der Membran wird der Kern der zukünftigen Spore abgeschnürt und von einer Doppelmembran umgeben (Abb. 1 f). Diese Doppelmembran entwickelt sich dann zur Sporenwand (Neiman, 1998).

Endocytotisch aufgenommene, aber auch neu synthetisierte Membranproteine, die für die Vakuole bestimmt sind, werden im prävakuolären Kompartiment sortiert. Dies geschieht über die Einstülpung der äußeren Membran dieses Kompartimentes, wobei bestimmte Proteine, wie die vakuoläre Protease Carboxypeptidase S oder der Pheromonrezeptor Ste2p, gezielt in die Einstülpung sortiert werden. Durch Abschnürung von Vesikeln ins Lumen dieses Kompartiments entsteht der "Multivesicular Body" (MVB), dessen innere Membranen andere Proteine tragen als die äußere Membran. Der MVB fusioniert mit der Vakuole, wodurch die enthaltenen Vesikel ins Vakuolenlumen gelangen, die äußere Membran aber Teil der Vakuolenmembran wird (Abb. 1 d). Für diesen Proteinsortierungsmechanismus wird die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Phosphat-5-Kinase Fab1p benötigt (Odorizzi et al., 1998), als Signal für die Aufnahme ins Innere des MVB dient die Ubiquitynylierung von Membranproteinen (Katzmann et al., 2001).

Auch Säugerzellen sortieren Proteine im MVB (Piper und Luzio, 2001). Dadurch werden beispielsweise endocytotisch aufgenommen Hormonrezeptoren, alternativ zum abermaligen Einbau in die Plasmamembran, in das Lysosom transportiert und abgebaut. Die Einstülpung der Membranen kann durch Wortmannin, einen Hemmstoff von Phosphatidylinositolkinasen, gehemmt werden (Fernandez-Borja et al., 1999). Der Transport von zum Abbau bestimmten Rezeptortyrosinkinasen in die Einstülpung ist abhängig von deren Kinaseaktivität (Felder et al., 1990) und von Annexin I (Futter et al., 1993). Die inneren Membranen des MVB von Säugerzellen reichern das ungewöhnliche Lipid Lysobisphosphatidsäure an, gegen das beim Antiphospholipidsyndrom Immunglobuline gebildet werden. Diese Antikörper stören die Struktur des MVB, was die Pathologie des Antiphospholipidsyndroms mit bestimmt (Kobayashi et al., 1998).

Die in den MVB eingeschlossenen Vesikel können nicht nur lysosomal abgebaut werden, alternativ können sie auch durch Exocytose freigesetzt werden (Abb. 1 e). Man spricht dann von Exosomen (Denzer et al., 2000). Das am besten untersuchte Beispiel für die Exosomenbildung ist die Reifung von Retikulocyten. Dabei werden die nicht mehr benötigten Transferrinrezeptoren endocytiert, in die inneren Vesikel des MVB sortiert und mit Exosomen freigesetzt (Pan und Johnstone, 1983; Pan et al., 1985). Das Signal für die Sortierung von Proteinen in die inneren Vesikel scheint dabei die Aggregation zu großen Komplexen zu sein (Vidal et al., 1997).

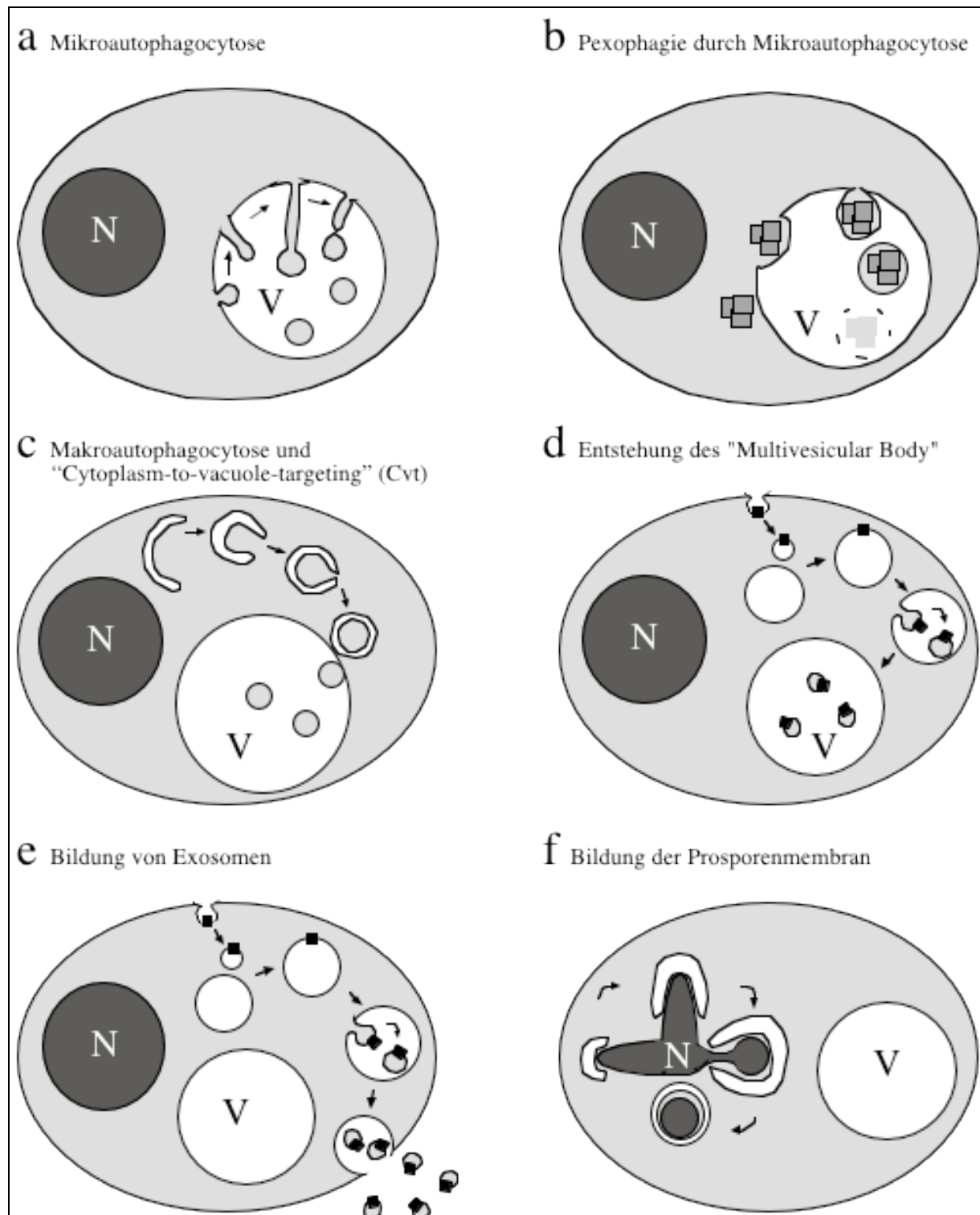


Abb. 1. Mikroautophagocytose und verwandte Prozesse. Alle der gezeigten Prozesse beinhalten die Bildung von Vesikeln auf der luminalen Seite eines Zellorganells. N-Nukleus, V-Vakuole. **a** Mikroautophagocytose in *Saccharomyces cerevisiae* (nach Müller et al., 2000), **b** Mikropexophagie in *Pichia pastoris* (nach Sakai et al., 1998), **c** Makroautophagocytose bzw. Cvt-Weg in *Saccharomyces cerevisiae* (nach Scott und Klionsky, 1998), **d** Abbau von Proteinen der Plasmamembran nach Sortierung im MVB (nach Odorizzi et al., 2000), **e** Bildung von Exosomen (nach Denzer et al., 2000), **f** Bildung der Prosporenmembran in *Saccharomyces cerevisiae* (nach Neiman, 1998).

Neben Retikulozyten sezernieren auch andere Zelltypen Exosomen, wie beispielsweise Thrombocyten (Heijnen et al., 1999), Mastzellen (Raposo et al., 1997), B-Lymphocyten (Escola et al., 1998) und dendritische Zellen (Théry et al., 2001). Die Funktion dieser Exosomen ist nicht in allen Fällen bekannt; bei B-Lymphocyten und dendritischen Zellen nimmt man an, daß Exosomen der Antigenpräsentation dienen. Dies wird durch die Analyse der Proteinzusammensetzung von Exosomen dendritischer Zellen gestützt: Sie enthalten MHC Klasse II-, MHC Klasse I- und CD86- Moleküle, welche als Costimulans für die Aktivierung von T-Lymphocyten benötigt werden. Auch für die Entstehung von Exosomen lieferte die Analyse ihrer Proteinzusammensetzung wichtige Hinweise: Neben am Membrantransport beteiligten Faktoren wie kleinen Rab-GTPasen und Annexinen sind auch Komponenten des Cytoskeletts wie Actin, Cofilin, Profilin und Tubulin in der Exosomenmatrix angereichert (Théry et al., 2001).

Alle diese Vorgänge beruhen auf demselben elementaren Prozeß, der Einstülpung von Vesikeln auf der luminalen Seite von Zellorganellen. Alle bisher bekannten, an Membrantransportprozessen beteiligten Proteinklassen sind von der Hefe bis zum Mensch konserviert, dazu zählen beispielsweise die kleinen Rab-GTPasen und die SNARE-Proteine (Bock et al., 2001). Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt aufgrund ihrer Zugänglichkeit für viele biochemische, genetische und zellbiologische Methoden ein beliebtes Modellsystem dar, das Rückschlüsse auf die Zellbiologie von Eukaryonten allgemein zuläßt (Basset et al., 1996; Daum, 2000; Rubin et al., 2000; Costanzo et al., 2001; Gavin et al., 2002). Die Untersuchung der Mikroautophagozytose an isolierten Hefevakuolen dient also auch als Modellsystem für die genannten Vorgänge in anderen Zelltypen.

1.4. Zielsetzung

Die Messung der Mikroautophagocytose an isolierten Hefevakuolen sollte verwendet werden, um niedermolekulare Hemmstoffe dieser Reaktion zu finden und dadurch Hinweise auf die an der Mikroautophagocytose beteiligten Komponenten zu erhalten.

Des Weiteren sollten Aut- und Apg-Proteine exprimiert werden und zur Antikörperherstellung benutzt werden. Die gegen diese Proteine gerichteten Antikörper sollten auf ihre Wirkung in der *in vitro*-Mikroautophagocytose untersucht werden.

Die so gefundenen Hemmstoffe sollten eingesetzt werden, um die Mikroautophagocytose *in vitro* kinetisch in verschiedene Stufen aufzulösen.

Die Rolle von Komponenten, auf deren Beteiligung an der Mikroautophagocytose durch die Wirkung von Hemmstoffen Hinweise erhalten wurden, sollte weiter charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Ausstattung

Blender, 4l, Waring Commercial, New Hartford, USA
Brutschrank BE200-800, Memmert, Schwabach
Elektrophoresenetzgerät EPS 600, Pharmacia, Freiburg
Elektrotransferapparaturen Nova Blot, Pharmacia, Freiburg
IMM-1-ATM, The W.E.P. Company, Seattle, USA
Elektronenmikroskop CM10, Philips, Kassel
Feinwaage, Sartorius, Göttingen
Filmentwickelmaschine Curix 60, Agfa-Gevaert, Dübendorf
Gefrierapparatur JFD 030, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein
Gefriersubstitutionsapparatur FSU 010, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein
Gelkamera CN-TFX, MWG-Biotech, Ebersberg
Geltrockenapparatur „Easy Breeze“, Pharmacia, Freiburg
15 ml Glaszentrifugenröhrchen Corex, Nr. 00152, DuPont, Wilmington, USA
30 ml Glaszentrifugenröhrchen Corex, Nr. 8445, DuPont, Wilmington, USA
Heizblock 5320, Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler InnovaTM 4330, New Brunswick Scientific, Nürtingen
Konfokalmikroskop TCS SPL, Leica Microsystems, Heidelberg
mit Leica Confocal Software, Leica Microsystems, Heidelberg
Kühlzentrifuge 4123, Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge Avanti J-25, Beckman, München
mit den Rotoren: JA-10.500, Beckman, München
JA-20 mit Adaptern, Beckman, München
JA 18.1 mit Adaptern, Beckman, München
SS34, DuPont, Wilmington, USA
Luminometer Microplate Luminometer LB 96 V, Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetrührer KMO2, Janke&Kunkel, Staufen
Mikroskop Axioplan, Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle Micro-Chef FM B 930 Q, Moulinex, Köln
Peristaltische Pumpe P1, Pharmacia, Freiburg
pH-Meter H19321, Hanna Instruments, Ronchi di Villafranca, Italien
Photometer Ultrospec 1000, Pharmacia, Freiburg
Pipetten, Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Probenheizschüttler 5436, Eppendorf, Hamburg
Rotor, Groschopp, Viersen
Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen
Ultrazentrifugen TL-100, L-60, Optima LE-80-K, Beckman, München
Centrikon T-1065, Centrikon T-2060, Kontron, Zürich, Schweiz
mit den Rotoren TLA45, Beckman, München
SW41, Beckman, München
50.2Ti, Beckman, München
Vakuum-Geltrockner „Speed Gel“ SG210D, Koch+Nagy, Fellbach-Oeffingen
Vortex, Scientific Instruments, Bohemia, USA
Wasserbad-Thermostat, Julabo, Seelbach

2.1.2. Einmalartikel

Centriplus 30, Nr. 4422, Amicon, Beverly, USA
Centricon 30, Nr. 4208, Amicon, Beverly, USA
Filterpapier GB 002, Schleicher&Schuell, Dassel
Haushaltsfolie, Nr 9068.1, Roth, Karlsruhe
Parafilm, Nr. 2596.1, Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße, Nr. 82-0337, Peqlab, Erlangen
PD-10 Entsalzungssäulen, Nr. 17-0851, Pharmacia, Freiburg
Pipettenspitzen 1ml, Nr. 740280, Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen 200 μ l, Nr. 739280, Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen 20 μ l, Nr. 9455885, Fisher Scientific, Schwerte
2 ml Polypropylensäulen, Nr. 29920, Pierce, Rockford, USA
5 ml Polypropylensäulen, Nr. 29922, Pierce, Rockford, USA
0.65 ml Reaktionsgefäße aus PE, silikonisiert, Nr. 11330, Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
1.5 ml Reaktionsgefäße aus PE, Nr. 72.690, Sarstedt, Nümbrecht
1.5 ml Reaktionsgefäße aus PE, silikonisiert, Nr. 11720, Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
15 ml Reaktionsgefäße aus PE, Nr. 188261, Greiner, Nürtingen
50 ml Reaktionsgefäße aus PE, Nr. 18827, Greiner, Nürtingen
1.5 ml Reaktionsgefäße aus Polyallomer, für den Einsatz in der Ultrazentrifuge, Nr. 357448, Beckman, München
Sterilfilter, Nr. SCGPT05RE, Millipore, Bedford, USA
Zellophan, Nr. 80-6121-99, Pharmacia, Freiburg

2.1.3. Reagenzien

Aceton, Nr. 9372.2, Roth, Karlsruhe
Acrylamid, Nr. 7906.2, Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix, Nr. 3029.1, Roth, Karlsruhe
Adenophostin, Nr. 115500, Calbiochem, La Jolla, USA
Agar, Nr. 0145-17, Difco, Detroit, USA
Agarose, Nr. 2269, Roth, Karlsruhe
Aktivierte CH-Sepharose, Nr. 17-0490-01, Pharmacia, Freiburg
Ammoniumacetat, Nr. 1115, Merck, Darmstadt
Amphotericin, Nr. A 4888, Sigma, Deisenhofen
Ampicillin, Nr. K029.2, Roth, Karlsruhe
APS, Nr. 13375.5, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Apyrase Grad VII, Nr. A6535, Sigma, Deisenhofen
Aristolochiasäure, Nr. 270-047, Alexis, Grünberg
ATP, Nr. 519987, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bactopepton, Nr. 0118-07, Difco, Detroit, USA
Bisacrylamid, Nr. 29195.03, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Bromphenolblau, Nr. 15375, Serva, Heidelberg
BSA, Nr. 8891.2, Roth, Karlsruhe
Calyculin A, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Cantharidin, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Chemilumineszenzsubstrat West Dura, Nr. 34075ZZ, Pierce, Rockford, USA
Chemilumineszenzsubstrat West Femto, Nr. 34095ZZ, Pierce, Rockford, USA
Chemilumineszenzsubstrat West Pico, Nr. 34080ZZ, Pierce, Rockford, USA

Cholesterol, Nr. C 8667, Sigma, Deisenhofen
Chromozym TH, Nr. 838268, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Coffein, Nr. 550-322, Alexis, Grünberg
Colchizin, Nr. 380-033, Alexis, Grünberg
Creatinphosphat, Nr. 621722, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Creatinkinase, Nr. 735988, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Cyclosporin A, Nr. 380-002, Alexis, Grünberg
Cytochalasin B, Nr. 380-012, Alexis, Grünberg
Cytochalasin D, Nr. 380-031, Alexis, Grünberg
DEAE-Dextran, Nr. 17-0350-01, Pharmacia, Freiburg
Deltamethrin, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Desoxyribonukleotidgemisch, U1330, Promega, Mannheim
Diacylglycerolkinaseinhibitor, Nr. 430-028, Alexis, Grünberg
DMSO, Nr. 102950.0500, Merck, Darmstadt
DTT, Nr. 6908.2, Roth, Karlsruhe
Edelfosine, Nr. 341207, Calbiochem, La Jolla, USA
EDTA, Nr. 808270, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Entwickler für Filme, Nr. HAT 536, Agfa-Gevaert, Dübendorf
Essigsäure, Nr. 3738.3, Roth, Karlsruhe
Ethanol, Nr. 9065.2, Roth, Karlsruhe
Ethanolamin, Nr. E9508, Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid, Nr. 161-0430, Biorad, München
F48/80, Nr. 234500, Calbiochem, La Jolla, USA
Farnesyltransferaseinhibitor, Nr. 290-005, Alexis, Grünberg
FCCP, Nr. C 2920, Sigma, Deisenhofen
10-Feld-Objektträger, Nr. 75751, Biomérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich
Filme, Nr. RPN 1674 H, Amersham, Braunschweig
Fixierer für Filme, Nr. G 354, Agfa-Gevaert, Dübendorf
Formaldehyd, Nr. 4979.1, Roth, Karlsruhe
Ficoll-400, Nr. 17-0400-02, Pharmacia, Freiburg
Glasperlen 0.25-0.5 mm, Nr. A553, Roth, Karlsruhe
Glucose, Nr. 0155-17, Difco, Detroit, USA
Glutardialdehyd, Nr. 3778.1, Roth, Karlsruhe
Glutathion, Nr. G 4251, Sigma, Deisenhofen
Glycerin, Nr. 23175.01, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Glycin, Nr. 3908.3, Roth, Karlsruhe
GDP β S, Nr. 480-081, Alexis, Grünberg
GSH-Sepharose, Nr. 17-0756, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
GTP β S, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Guanidiniumhydrochlorid, Nr. 0037.1, Roth, Karlsruhe
H9, Nr. 270-068, Alexis, Grünberg
Harnstoff, Nr. 24524.03, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
HCl, Nr. 6331.2, Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt, Nr. 0127-07, Difco, Detroit, USA
HEPES, Nr. 91052, Roth, Karlsruhe
HRP, Nr. P6782, Sigma, Deisenhofen
HRP-gekoppeltes antiKaninchen-Ig (Esel), Nr. NA 934, Amersham, Braunschweig
HRP-gekoppeltes antiMaus-Ig (Esel), Nr. NXA 931, Amersham, Braunschweig
Imidazol, Nr. 3899.2, Roth, Karlsruhe
D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat, Nr. 407137, Calbiochem, La Jolla, USA
IPTG, Nr. 26600.04, Boehringer Ingelheim, Heidelberg

Isopropanol, Nr. 6752.2, Roth, Karlsruhe
K252a, Nr. 380-027, Alexis, Grünberg
KCl, Nr. 6781.1, Roth, Karlsruhe
KH₂PO₄, Nr. 3904.1, Roth, Karlsruhe
K₂HPO₄, Nr. 105104.1000, Merck, Darmstadt
K₃PO₄, Nr. 1051031.0500, Merck, Darmstadt
KN62, Nr. 430-024, Alexis, Grünberg
KOH, Nr. 105029.1000, Merck, Darmstadt
KT5833, Nr. 270-087, Alexis, Grünberg
Latrunculin A, Nr. 428021, Calbiochem, La Jolla, USA
Leupeptin, Nr. 1017128, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Luciferase, Nr. 411523, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Luciferasemeßpuffer, Nr. ELA031, Berthold Detection Systems, Pforzheim
Luciferasesubstrat A, Nr. ELA011, Berthold Detection Systems, Pforzheim
Luciferasesubstrat B, Nr. ELA021, Berthold Detection Systems, Pforzheim
Luminol, Nr. A8511, Sigma, Deisenhofen
Manoalid, Nr. 350-045, Alexis, Grünberg
Mellitin, Nr. 162-006, Alexis, Grünberg
□-Mercaptoethanol, Nr. 4227.1, Roth, Karlsruhe
Methanol, Nr. 4627.3, Roth, Karlsruhe
3-Methyladenin, Nr. M 9281, Sigma, Deisenhofen
Methylarachidonoylfluorophosphonat, Nr. 340-017, Alexis, Grünberg
MgCl₂, Nr. 105833.1000, Merck, Darmstadt
Micro-BCA-Proteinnachweisreagenz, Nr. 23235, Pierce, Rockford, USA
Microcystin LR, Nr. 350-012, Alexis, Grünberg
Mineralöl, Nr. I 1330, Promega, Mannheim
MnCl₂, Nr. 105934.1000, Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE: Nr. SDS VII-L, Sigma, Deisenhofen
Nr. SDS 6H, Sigma, Deisenhofen
1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin, Nr. 855475, Avanti Polar Lipids,
Alabaster, USA
NaCl, Nr. 3957.2, Roth, Karlsruhe
Na₂CO₃, Nr. 8562.1, Roth, Karlsruhe
NaF, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
NaH₂PO₄, Nr. 1.06346.1000, Merck, Darmstadt
Na₂HPO₄, Nr. 106586.2500, Merck, Darmstadt
Na₃PO₄, Nr. 106578.1000, Merck, Darmstadt
NaN₃, Nr. K305.1, Roth, Karlsruhe
NaOH, Nr. 106469.1000, Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Natriumvanadat, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Neomycin, Nr. N 1876, Sigma, Deisenhofen
NH₃, Nr. 6774.1, Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose, Nr. 30230, Qiagen, Hilden
Nitrocellulosemembranen, Nr. 11307, Sartorius, Göttingen
p-Nitrophenylphosphat, Nr. 107905, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Nocodazol, Nr. 430-029, Alexis, Grünberg
Nystatin, Nr. 3503, Sigma, Deisenhofen
Okadasäure, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Oleinsäure, Nr. O 7501, Sigma, Deisenhofen
Oxalyticase, EnzoGenetics, Corvallis, USA

Paclitaxel, Nr. 351-001, Alexis, Grünberg
pCRT7/NT TOPO TA Cloning Kit, Nr. K4200-01, Invitrogen, Groningen, Niederlande
Pefabloc SC, Nr. 1429869, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Pepstatin A, Nr. 1359053, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Perillinsäure, Nr. 430-038, Alexis, Grünberg
antiPGK-Immunglobulin, Nr. A-6457, Molecular Probes, Eugene, USA
o-Phenanthrolin, Nr. 77510, Fluka, Buchs, Schweiz
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Nr. 2279, Applichem, Darmstadt
Phenylarsinoxid, Nr. K-210, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
antiPho8p-Immunglobulin, Nr. A-6458, Molecular Probes, Molecular Probes, Eugene, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat, Nr. 445-004, Alexis, Grünberg
Phospholipase A₂, Nr. 202-033, Alexis, Grünberg
Phosphorsäure, Nr. P6560, Sigma, Deisenhofen
PIPES, Nr. 1359045, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PMSF, Nr. 87091, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Podophyllotoxin, Nr. 630-086, Alexis, Grünberg
Polylysin, Nr. P 8920, Sigma, Deisenhofen
Polymyxin B, Nr. 380-040, Alexis, Grünberg
Ponceau S, Nr. 33429.02, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Proteinase K, Nr. 745723, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Protein A-Sepharose, Nr. 17-0974-01, Pharmacia, Freiburg
Proteinnachweisreagenz nach Bradford, Nr. 500-0006, Biorad, München
QIAprep Spin Miniprep Kit, Nr. 27106, Qiagen, Hilden
Rapamycin, Nr. 380-004, Alexis, Grünberg
RNase A, Nr. 109142, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
SDS, Nr. 20783.02, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Serva Blue G, Nr. 35050.02, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Serva Blue R, Nr. 35051.01, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Sorbitol, Nr. 6213.2, Roth, Karlsruhe
Staurosporin, Nr. 380-014, Alexis, Grünberg
Taq-DNA-Polymerase mit Puffer und MgCl₂, Nr. M 1661, Promega, Mannheim
TCA, Nr. 8789.1, Roth, Karlsruhe
TEMED, Nr. 35925.01, Roth, Karlsruhe
Thrombin, Nr. T 7009, Sigma
Tricine, Nr. 6977.1, Roth, Karlsruhe
Tris, Nr. 4855.2, Roth, Karlsruhe
Triton X-100, Nr. 93426, Sigma, Deisenhofen
U73122, Nr. 370-005, Alexis, Grünberg
Valinomycin, Nr. V 0627, Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid, Nr. H 6520, Sigma, Deisenhofen
Wortmannin, Nr. 350-020, Alexis, Grünberg
Yeast Lytic Enzyme, Nr. 36094, ICN Biomedicals, Aurora, USA
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat, Nr. 233520, Difco, Detroit, USA
Zitronensäure, Nr. 3958.1, Roth, Karlsruhe

2.1.4. Primer

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

apg5-1	5'-ATG AAT GAC ATT AAA CAA TTA-3'
apg5-2	5'-TTA GAG CTC AGA GGA AGC TTT-3'
apg6-1	5'-ATG AAG TGC CAA ACA TGT CAC-3'
apg6-2	5'-TTA GTT TCC GCT GAT GGT CTT-3'
apg10-1	5'-ATT CCT TAC CAG GAG TGG CAT-3'
apg10-2	5'-CTA TGA ATC TTC ATA ACC TAA-3'
apg16-1	5'-GGC AAT TTC ATT ATA ACA GAA AG-3'
apg16-2	5'-TCA TTT CGT TCC ATC TAT TTC-3'
aut1-1	5'-ATT AGA TCT ACA CTA AGT AGT TG-3'
aut1-2	5'-TTA CCA ACC TTC CAT GGT ATA G-3'
T7-Promotor	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

2.1.5. Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae BJ3505, Genotyp *MATa pep4::HIS3 prb1- Δ 1.6R HIS3 lys2-208 trp1- Δ 101 ura3-52 gal2 can*. Diesem Stamm fehlt die Proteinase A (Pep4p). Sie ist zur Prozessierung einer Reihe vakuolärer Hydrolasen nötig (Jones et al., 1997). Der Stamm wurde für Immunfluoreszenzfärbungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen eingesetzt, da er unter Hungerbedingungen autophagische Körperchen in der Vakuole anreichert und da proteolytische Schäden während der Fixierung minimiert sind.

Saccharomyces cerevisiae K91-1A, Genotyp *MAT Δ ura3 pho8::pAL134 pho13::pH13 lys1*. Diesem Stamm fehlt die cytosolische Phosphatase Pho13p, so daß Cytosol dieses Stammes in die Reaktion zur Messung der *in vitro*-Autophagocytose eingesetzt werden konnte, ohne die photometrische Phosphatasebestimmung zu stören (Sattler und Mayer, 2000).

Saccharomyces cerevisiae DBY5734, Genotyp *MATa ade2 lys2 his3 trp1 leu2 ura3 cmd1- Δ 1::TRP ade3::HIS3::CMD1*. Dieser Stamm wurde zur Präparation von Vakuolen für die Messung der *in vitro*-Autophagocytose verwendet (Sattler und Mayer, 2000).

Saccharomyces cerevisiae YTS1, Genotyp *MATa aut1::KAN1 ade2 lys2 his3 trp1 leu2 ura3 cmd1- \square 1::TRP ade3::HIS3::CMD1* (Sattler und Mayer, 2000). Dieser Stamm wurde zum Testen der affinitätsgereinigten antiAut1p-Antikörper eingesetzt.

Saccharomyces cerevisiae YTS5, Genotyp *MATa apg5::KAN2 ade2 lys2 his3 trp1 leu2 ura3 cmd1- \square 1::TRP ade3::HIS3::CMD1* (Sattler und Mayer, 2000). Dieser Stamm wurde zum Testen der affinitätsgereinigten antiApg5p-Antikörper eingesetzt.

Saccharomyces cerevisiae YST12, Genotyp *MATa apg6::KAN pep4::HIS3 prb1- \square 1.6R HIS3 lys2-208 trp1- \square 101 ura3-52 gal2 can* (Sven Thoms, Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen). Dieser Stamm wurde zum Testen der affinitätsgereinigten antiApg6p-Antikörper eingesetzt.

Saccharomyces cerevisiae SBY83, Genotyp *MATa vtc4::KAN pep4::LEU gal2 ura3-52 lys2-801 ade2-107 his3 \square 200* (Müller et al., 2002). Dieser Stamm wurde zur Depletion von kreuzreagierenden Antikörpern aus antiVtc4p-Immunglobulin verwendet.

2.1.6. Bakterienstämme

E. coli TOP10F^c, Genotyp F^c {lacI^q, Tn10(Tet^R)} *mcrA* \square (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) \square 80*lacZ* \square M15 \square *lacX74 recA1 deoR araD139* \square (*ara-leu*)7697 *galU rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*. Dieser Stamm wurde zur Vervielfältigung von Plasmiden verwendet.

E. coli BL21(DE3), Genotyp F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) (Studier et al., 1990). Dieser Stamm diente zur Proteinexpression.

E. coli BL21(DE3)pLysS, Genotyp F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (Invitrogen). Dieser Stamm diente zur Proteinexpression. Er exprimiert plasmidcodiertes T7-Lysozym, wodurch einerseits das basale Expressionsniveau von dem T7-Promotor nachgeschalteten Genen niedrig gehalten wird und andererseits der Zellaufschluß erleichtert wird.

E. coli M15, Genotyp F⁻ Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺ pREP4 (Qiagen). Der Stamm wurde zur Proteinexpression verwendet. Er exprimiert plasmidcodierten

lac-Repressor, wodurch das basale Expressionsniveau von dem T7-Promotor nachgeschalteten Genen niedrig gehalten wird.

2.1.7. Antikörper

Monoklonales antiPho8p wurde von Molecular Probes, Eugene, USA bezogen und in Konzentrationen von 1 µg/ml bzw. 0.5 µg/ml zur Dekoration von Western Blots eingesetzt.

Monoklonales antiHis₆-Tag wurde von Qiagen, Hilden bezogen und in Konzentrationen von 1 µg/ml zur Dekoration von Western Blots eingesetzt.

Kaninchen-antiActin zur Dekoration von Western-Blots wurde freundlicherweise von Dr. Anne Spang, Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen zur Verfügung gestellt.

Monoklonales antiActin wurde von Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada bezogen (Nr. CLT-9001).

Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper zur Immunfluoreszenz wurden freundlicherweise von Dr. Heinz Schwarz, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Seren waren durch Injektion rekombinant hergestellter Antigene in Kaninchen erzeugt worden.

2.2. Methoden

Alle der im folgenden genannten Lösungen wurden, falls nicht anders erwähnt, mit deionisiertem Wasser angesetzt (MilliQ, Millipore, Bedford, USA). Arbeiten mit nativen Proteinen wurden in silikonisierten Reaktionsgefäßen ausgeführt.

2.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford

10 μ l Probe einer Proteinkonzentration im Bereich von 0.02 bis 0.4 mg/ml wurde zu 1 ml Proteinbestimmungsreagenz (Biorad) gegeben und nach ca. 2 min bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard diente BSA.

2.2.2. Proteinbestimmung mittels BCA

Diese Methode der Proteinbestimmung wurde für detergenzhaltige Proben eingesetzt. 10 μ l Probe einer Proteinkonzentration von 0.05 bis 1 mg/ml wurden zu 1 ml des BCA-Reagenzgemisches (Pierce) gegeben und für eine Stunde auf 60°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Als Standard diente BSA.

2.2.3. Hefekultur

Mittels steriler Zahnstocher wurde von bei -80°C in 15% (w/v) Glycerin gelagerten Zellen ein kleiner Teil auf YPD-Agar (2% (w/v) Bactopepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose, 2% (w/v) Agar) ausgestrichen und die Platten bei 30°C für drei Tage inkubiert. Die so erhaltenen Vorratsplatten wurden ca. drei Wochen bei 4°C aufbewahrt, bis sie erneuert wurden. Mit einzelnen Kolonien von den Vorratsplatten wurden 30 ml YPD-Medium (2% (w/v) Bactopepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose) als Vorkultur angeimpft und für 6-8 h bei 30°C und 225 rpm geschüttelt. Am Abend bevor die Zellen geerntet werden sollten, wurde die OD_{600} der Vorkultur gemessen und die Hauptkulturen so angeimpft, daß unter Annahme logarithmischen Wachstums am nächsten Morgen eine OD_{600} von 2-5 (entsprechend einer Zelldichte von $7.2 \cdot 10^7$ bis $1.8 \cdot 10^8$ ml⁻¹) zu erwarten war. Dabei wurde eine Verdopplungszeit von 80 min für DBY5734 und K91-1A zugrunde gelegt.

Sollten die Zellen gehungert werden, wurden sie bei einer OD_{600} von 2-5 geerntet (3750 g; JA-10.500; 5min; 4°C), einmal in SD-N (1.7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat, 2% (w/v) Glucose) gewaschen und zu einer OD_{600} von 5 in SD-N aufgenommen. Vor der endgültigen Ernte wurden sie 3-5 h bei 30°C und 225 rpm geschüttelt.

2.2.4. Vakuolenpräparation

Hefezellen aus der logarithmischen Wachstumsphase mit OD_{600} zwischen 2 und 5 wurden geerntet (3750 g; JA-10.500; 5min; 4°C). Die Mengenangaben im Folgenden beziehen sich

auf 2000 OD₆₀₀-Einheiten an DBY5734-Zellen, also auf einen mit einer Zellsuspension von OD₆₀₀=4 gefüllten JA-10.500-Zentrifugenbecher. Das Zellpellet wurde in 50 ml 30 mM Tris/HCl pH 8.9/10 mM DTT resuspendiert und 5 min bei 30°C inkubiert, um die Zellwände aufzuweichen. Danach wurden die Zellen wieder geerntet (3750 g; JA-10.500; 3 min; 4°C) und in 15 ml Sphäroplastierungspuffer (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7.5, 600 mM Sorbitol) in YP-Medium/ 0.2% Glucose aufgenommen. Nach Zugabe von 0.3 ml Oxalyticaselösung (2 mg/ml, entsprechend 90000 U/ml) wurde die Zellsuspension in 30 ml Corex-Glasröhrchen transferiert und 20 min bei 30°C inkubiert. Alternativ zu Oxalyticase wurde Yeast Lytic Enzyme (50 mg/ml) verwendet, dann wurde für 25 min mit 450 µl Enzymlösung verdaut. Der Verdau wurde gestoppt, indem die Sphäroplasten abzentrifugiert wurden (erst 1 min bei 880 g, dann 1 min bei 1650 g; JA-20 mit Adaptern; 4°C) und der Überstand vorsichtig abgegossen wurde. Das Pellet wurde in 2.5 ml eiskaltem 15% Ficoll (in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol) mit Hilfe einer Glaspipette resuspendiert und 150 µl DEAE-Dextran (0.4 mg/ml in 15% Ficoll) zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis, während der das DEAE-Dextran an die Plasmamembranen der Sphäroplasten binden konnte, wurden die Sphäroplasten bei 30°C für 80 s lysiert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt, in SW41-Röhrchen überführt und mit 3 ml 8% Ficoll (in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol), 3 ml 4% Ficoll (in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol) und 0% Ficoll (10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol) bis zum Oberrand des Röhrchens überschichtet. Die nach der Lyse freigesetzten Vakuolen wurden durch Zentrifugation (154000 g; SW41; 90 min; 4°C) an die Grenzschicht 4%/0% Ficoll aufflotiert und von dort geerntet. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.2.1.), typische Ausbeuten waren 0.5 ml Vakuolensuspension einer Proteinkonzentration von 0.8 mg/ml pro Röhrchen.

Vakuolen wurden bei -80°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt. Dazu wurde zu den frisch isolierten Vakuolen Proteaseinhibitorcocktail (0.2 mM Pefabloc, 0.2 µg/ml Leupeptin, 1 mM *o*-Phenanthrolin, 1 µg/ml Pepstatin A) und 10% (w/v) Glycerol (aus 50% in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol) gegeben. Die Vakuolensuspension wurde in flüssigen Stickstoff eingetroppt.

2.2.5. Cytosolpräparation

Für die Cytosolpräparation wurden K91-1A-Zellen 5 h in SD-N gehungert (siehe 2.2.3.). Die Zellen (10^8 l, $OD_{600}=5$) wurden geerntet (3750 g; JLA 10.500; 5 min; 4°C), vereinigt und einmal mit eiskaltem Cytosolpuffer (200 mM Sorbitol, 40 mM PIPES/KOH pH 6.8, 0.5 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1xPIC: 0.1 mM Pefabloc, 0.1 μ g/ml Leupeptin, 0.5 mM *o*-Phenanthrolin, 0.5 μ g/ml Pepstatin A) gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in wenig eiskaltem Cytosolpuffer aufgenommen, so daß eine dicke Suspension entstand. Diese Suspension wurde in flüssigen Stickstoff eingetropft, so daß etwa erbsengroße Eisstücke entstanden, und in einem vorgekühlten Waring-Blender fünfmal für ca. 40 s auf höchster Stufe gemixt. Dabei wurde, falls nötig, flüssiger Stickstoff nachgefüllt, so daß das Eis nie auftauen konnte. Danach wurde solange weiter gemixt, bis der Stickstoff verdampft war; die Suspension wurde unter warmem Wasser aufgetaut und zentrifugiert (18500 g; JLA 10.500; 10 min; 4°C). Das so geklärte Lysat wurde nochmals zentrifugiert (184000 g; 50.2 Ti; 20 min; 4°C) und aufschwimmendes Lipid verworfen. Bildete sich während dieser Zentrifugation bedingt durch die hohe Proteinkonzentration ein Dichtegradient, der die Sedimentation oder Flotation von Membranfragmenten verhinderte, so wurde nach Mischen nochmals bei kleinerer Beschleunigung zentrifugiert (12000 g; 50.2 Ti; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, durch Verdünnung mit Cytosolpuffer auf eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml gebracht, in 100 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Aktivität des Cytosols zur Stimulierung der *in vitro*-Autophagocytose wurde titriert, 2.5 - 3 mg/ml stimulierten die Reaktion maximal.

2.2.6. Messung der Aktivität Alkalischer Phosphatase

Zur Probe (10-50 μ l) wurden 500 μ l Entwicklungslösung (10 mM $MgCl_2$, 1 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 0.4% (w/v) Triton X-100, 250 mM Tris/HCl pH 8.9) gegeben, 5 min bei 30°C inkubiert und die Entwicklung durch Zugabe von 500 μ l 1 M Glycin/KOH pH 11.5 abgestoppt. Die Extinktion des entstandenen *p*-Nitrophenolats wurde bei 405 nm gemessen. Reduktionsmittel (z.B. DTT) stören die Reaktion.

2.2.7. Messung von Luciferaseaktivität

Die Proben (25 μ l, in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol) wurden in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert, je 25 μ l Luciferasemeßpuffer und Luciferasesubstrat A zugegeben und gemischt. Unmittelbar vor der Messung wurden 25 μ l Luciferasesubstrat B zugegeben.

Die Lumineszenz wurde im Luminometer gemessen. Luciferasemeßpuffer (enthält Detergenz und Reduktionsmittel), Luciferasesubstrat A (ATP) und Luciferasesubstrat B (1 mM Luciferin) wurden von Berthold Detection Systems, Pforzheim bezogen.

2.2.8. Messung von Meerrettichperoxidaseaktivität

Die Proben (25 μ l, in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol, 1% Triton X 100) wurden in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert, je 25 μ l Substrat (5 mM Luminol, 10 mM H₂O₂, 100 mM Tris/HCl pH 8.5; H₂O₂ wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben) und Cosubstrat (200 μ M Luciferin, 100 mM Tris/HCl pH 8.5) zugegeben und gemischt. Die Lumineszenz wurde unmittelbar nach Substratzugabe im Luminometer gemessen, der Reagenzienleerwert wurde von allen Meßwerten abgezogen.

2.2.9. Messung von Thrombinaktivität

Zur Probe (10 μ l) wurden 500 μ l Chromozym TH-Lösung (50 μ M in 50 mM Tris/HCl pH 8.3, 227 mM NaCl, 1 mg/ml BSA) gegeben und bei 25°C inkubiert. Bei deutlicher Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1 M Glycin/KOH pH 11.5 gestoppt und sofort die Extinktion bei 405 nm gemessen. Die auf die Proteinmenge bezogene Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$U/\mu\text{g Protein} = (V \cdot E_{405}) / (p \cdot \epsilon_{405} \cdot d \cdot t) \text{ mit}$$

V= Testvolumen (1 ml)

E₄₀₅= gemessene Extinktion bei 405 nm

p= eingesetzte Proteinmenge in μ g

ϵ_{405} = Extinktionskoeffizient des entstehenden Nitroanilids (10,4 mmol⁻¹·l·cm⁻¹)

d= Schichtdicke der Meßküvette (1 cm)

t= Reaktionsdauer (5 bis 180 min)

2.2.10. Messung der *in vitro*-Autophagocytose

Vakuolen des Stammes DBY5734 wurden zur Messung der *in vitro*-Autophagocytose frisch präpariert oder von -80°C aufgetaut und auf eine Konzentration von 0.4 mg/ml Protein mit 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol verdünnt. Ein Reaktionsansatz zu 50 μ l (0.2 mg/ml DBY 5734-Vakuolen, 3 mg/ml cytosolisches Protein, 105 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 80 mM Dinatriumcreatinphosphat, 175 U/ml Creatinkinase, 17 μ g/ml Luciferase,

100 μM DTT, 0.1 mM Pefabloc, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 0.5 mM *o*-Phenanthrolin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A, 200 mM Sorbitol, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8) erhielt:

25 μl DBY5734-Vakuolen, 0.4 mg/ml

5 μl ATP-regenerierendes System (20 mM Mg^{2+} -ATP, 800 mM Creatinphosphat, 5 mg/ml Creatinkinase (entsprechend 1750 U/ml), 5% (w/v) Glycerin, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8)

5 μl 0.9 M KCl in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol

5 μl 50 mM MgCl_2 in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol

5 μl Cytosol von gehungerten K91-1A-Zellen, 30 mg/ml

1 μl 0.85 mg/ml Luciferase in 150 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol

ad 50 μl : 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol.

Das Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 27°C inkubiert, als Kontrolle diente ein Ansatz, der auf Eis gehalten wurde. Bei Ansätzen ohne ATP wurde das ATP-regenerierende System durch dasselbe Volumen 0.9 M KCl ersetzt, um die Ionenstärke insgesamt konstant zu halten. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze auf Eis gestellt und mit 300 μl eiskaltem Waschpuffer (150 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol) verdünnt. Die Vakuolen wurden pelletiert (6800 g; 4 min; 2°C; in Tischzentrifuge), einmal mit 300 μl Waschpuffer gewaschen und in 50 μl 150 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol resuspendiert. Proteinase K wurde zu 0.3 mg/ml aus einer 3 mg/ml Stammlösung zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Der Proteaseverdau wurde durch Zugabe von 50 μl 1 mM PMSF in eiskaltem 150 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol gestoppt. Je 25 μl wurden zur Messung der aufgenommenen Luciferase (siehe 2.2.7.) und der Alkalischen Phosphatase (siehe 2.2.6.) verwendet. Der Quotient dieser beiden Werte (cps/OD₄₀₅) diente als Maß für die auf die Vakuolenmenge bezogene Luciferaseaufnahme. In einzelnen Experimenten wurde anstelle von Luciferase Meerrettichperoxidase (2 mg/ml) eingesetzt (zur Aktivitätsbestimmung siehe 2.2.8.).

2.2.11. TCA-Fällung

Zur Konzentrierung von Proteinen für die SDS-PAGE wurden diese durch Zugabe von 72% (w/v) TCA zu einer Endkonzentration von 12% (w/v) gefällt. Nach 5 min auf Eis wurde zentrifugiert (20000 g; 10 min; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 700 μl

eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in Laufpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen.

2.2.12. Proteinextrakt aus ganzen Hefezellen (Rödel-Aufschluß)

1 OD₆₀₀-Einheit Hefezellen wurde geerntet (20000 g; 30 s; Tischzentrifuge), einmal gewaschen (in 0.5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) und in 0.5 ml Wasser resuspendiert. Dann wurden 75 µl Lyselösung (1.85 M NaOH, 7.4% (v/v) β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA) zugegeben und 10 min bei 4°C geschüttelt. Durch Zugabe von 280 µl 72% (w/v) TCA wurden Proteine ausgefällt (5 min, auf Eis) und pelletiert (20000 g; 10 min; 4°C), dann zweimal mit 0.7 ml Aceton gewaschen, getrocknet und in 50 µl SDS-PAGE-Ladepuffer (siehe 2.2.13.) aufgenommen.

2.2.13. SDS-PAGE

Gießen der Polyacrylamid-Gele

Glasplatten (135x160 mm²) wurden mit deionisiertem Wasser und mit Ethanol gereinigt, Abstandshalter (0.6 oder 1 mm dick) mit Hilfe von Klemmen dazwischen befestigt und die Gelform in den Gelfuß gestellt. Um die Gelform auch nach unten dicht abzuschliessen, wurde in den Gelfuß etwa 1 ml verflüssigter Agarose (in SDS-Laufpuffer) gegeben. Die Acrylamidlösung für ein 8%iges Trenngel (90x140x1 mm³) wurde wie folgt zusammengemischt: 4.5 ml Acrylamid/Bisacrylamidgemisch (30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid), 6.5 ml 1 M Tris/HCl pH 8.8, 5.7 ml Wasser, 167 µl 10% (w/v) SDS, 10 µl TEMED, 100 µl 10% (w/v) APS. Für Gele mit anderem Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt wurden entsprechend andere Mengen an Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch und Wasser eingesetzt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses sofort mit Isopropanol überschichtet. Der Isopropanol wurde nach dem Polymerisieren abgegossen und ein 5%iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen (10x140x1 mm³; 830 µl Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch, 500 µl 0.6 M Tris/HCl pH 6.8, 3.6 ml Wasser, 50 µl 10% (w/v) SDS, 5 µl TEMED, 25 µl 10% (w/v) APS). Die Gele wurden in einer feuchten Box bei 4°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt.

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Die Proteinproben wurden in SDS-PAGE-Ladepuffer (60 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 0.005% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und 5 min auf 95°C erhitzt. Die abgekühlten Proben wurden in die Geltaschen geladen; dabei wurden für kleine Proteinmengen (bis 60 μ g) bei erwünschter hoher Effizienz des Elektrotransfers dünne Gele (0.6 mm) verwendet, bei größeren Proteinmengen (bis 200 μ g) wurden dicke Gele (1mm) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer Vertikalapparatur für 2-3 h bei 30 mA und Raumtemperatur in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.3, 380 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine entweder gefärbt oder zur Immunodekoration auf Nitrocellulose transferiert.

2.2.14. Western Blot

Acht Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran, jeweils in der Größe des Gels, aus dem die Proteine transferiert werden sollten, wurden in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0.02% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkt. Auf der Anodenplatte der Elektrotransferapparatur wurden von unten nach oben geschichtet: Vier in Transferpuffer getränkte Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, das Gel, nochmals vier Filterpapiere. Die Kathodenplatte der Apparatur wurde aufgelegt und mit einem Gewicht von 3 kg beschwert. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 2 mA pro Quadratzentimeter Gelfläche. Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran für eine Minute in Ponceau S-Färbelösung (0.2% (w/v) in 3% (w/v) TCA) geschwenkt und anschließend in demineralisiertem Wasser entfärbt. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker wurden mit Kugelschreiber markiert, die Membran getrocknet und photokopiert. Danach wurde 30 min in Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver, 0.2 % (w/v) Natriumazid in PBS: 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 136.8 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.2 mit HCl eingestellt) bei Raumtemperatur geschwenkt, dann eine Stunde bei Raumtemperatur oder wahlweise über Nacht bei 4°C in dem primären Antikörper (Verdünnungen von 1:1000 bis 1:3000 in Blockierungspuffer). Die Membran wurde mit mehrmaligem Pufferwechsel in PBS, PBS/T (0.05% (w/v) Triton X-100 in PBS) und nochmals PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur in dem sekundären Antikörper (1:10000 HRP-gekoppeltes antiKaninchen- oder antiMaus-Immunglobulin (Amersham) in 5% (w/v) Milchpulver, PBS) geschwenkt. Nach erneutem Waschen in PBS, PBS/T und PBS wurden 10 μ l Chemilumineszenzsubstrat (Pierce) pro Quadratzentimeter gleichmäßig auf der Membran

verteilt, die Membran faltenfrei in Haushaltsfolie eingehüllt und im Dunkelraum zusammen mit einem Film in die Filmkassette gelegt. Je nach Stärke des Signals waren unterschiedlich lange Belichtungszeiten bei verschiedenen empfindlichen Chemilumineszenzsubstraten nötig. Die Filme wurden in der Filmentwicklungsmaschine automatisiert entwickelt, fixiert und gewaschen. Gebundene Antikörper konnten durch Schwenken in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid (10 min bei Raumtemperatur) entfernt werden; vor einer erneuten Dekoration wurde nochmals in Blockierungspuffer geschwenkt.

2.2.15. Coomassie-Färbung

Das Gel wurde in einer Färbewanne mit Färbelösung (0.1% (w/v) Serva Blue G in 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) bedeckt, diese in der Mikrowelle kurz erhitzt, bis sich Blasen bildeten und 20 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Färbelösung wurde gegen Entfärbelösung (40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) ausgetauscht, die innerhalb von zwei bis drei Stunden mehrmals gewechselt wurde. Das Entfärben konnte durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle beschleunigt werden. Entfärbte Gele wurden auf Filterpapier in einem Vakuum-Geltrockner bei 80°C für 45 min getrocknet.

2.2.16. Immunfluoreszenzmikroskopie

Formaldehyd wurde frisch aus Paraformaldehyd hergestellt: Paraformaldehyd wurde zu 30% (w/v) in 100 mM PIPES/KOH, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, pH 6.9 suspendiert und unter Rühren auf 65°C erhitzt. Unter Rühren wurde langsam 10 N NaOH zugegeben, bis die Lösung nur noch leicht trübe war. Die Lösung wurde zentrifugiert, der Überstand zum Fixieren von Zellen eingesetzt.

Objekträger wurden mit Polylysin beschichtet: 20 µl 0.1% (w/v) Polylysinlösung wurden auf jedes Feld gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Polylysinlösung abgesaugt, die Felder je 5mal mit deionisiertem Wasser gewaschen und an Luft getrocknet.

Zellen (25 ml, OD₆₀₀=2) wurden durch Zugabe von Formaldehyd (zu 5% (w/v) aus 25% (w/v) frisch hergestellter Stammlösung) zum Medium fixiert. Nach 1 h bei 30°C wurden sie geerntet, in frischem Fixativ (3.7% (w/v) Formaldehyd, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6.5) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur rotiert.

Anschließend wurden die Zellen dreimal in SP (1.2 M Sorbitol, 0.5 mM MgCl₂, 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6.5) gewaschen und in 1 ml SP resuspendiert. Durch Zugabe von 1.4 µl β-Mercaptoethanol und 40 µl Oxalyticase (2 mg/ml) wurden die Zellwände verdaut. Der Verdau wurde mikroskopisch kontrolliert und nach 50-90 min gestoppt, indem die Zellen zweimal in SP gewaschen wurden. Die so vorbereiteten Zellen konnten in 50% (w/v) Glycerol/1 mM PMSF bei -20°C über Wochen aufbewahrt werden.

Alle der folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. 10 µl der fixierten und verdauten Zellen wurden auf ein Feld eines mit Polylysin beschichteten Objektträgers gegeben und 10 min inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit Detergenz behandelt (je 20 µl 2% (w/v) SDS in PBS (siehe 2.2.14.), 2 min) und gewaschen (5mal, mit PBS/ 1% (w/v) BSA). Anschließend wurde mit PBS/ 1% (w/v) BSA für 20 min geblockt und mit dem primären Antikörper (je 10 µl in PBS/ 1% (w/v) BSA) für 3 h inkubiert. Nach abermaligem Waschen (10mal, PBS/ 1% (w/v) BSA) wurden sekundäre Antikörper (Esel-antiMaus-Cy3 1:300, Esel-antiZiege-DTAF 1:250 in PBS/ 1% (w/v) BSA) zugegeben. Nach 1 h wurde letztmals gewaschen (5mal PBS/ 1% BSA, 5mal PBS), 2 µl Einbettungsmedium (50% Glycerol in PBS) zugegeben, ein Deckglas aufgelegt und mit Nagellack umrahmt.

2.2.17. Reinigung von antiVtc4p für Immunfluoreszenz

Vtc4-Deletionsmutanten (SBY83) wurden wie unter 2.2.16. beschrieben fixiert und verdaut, es wurden jedoch 10mal mehr Zellen verwendet. Nach dem Oxalyticaseverdau wurden die Zellen für 2 min mit 2% (w/v) SDS/PBS (PBS: siehe 2.2.14.) behandelt, dreimal in SP (siehe 2.2.15.) gewaschen und über Nacht mit 1% (w/v) BSA/PBS geblockt. Zellen entsprechend 500 OD₆₀₀-Einheiten wurden in 500 µl PBS/ 1% BSA aufgenommen und 50 µg affinitätsgereinigtes antiVtc4p (Ziege) zugeben. Es wurde 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand und 500 µl Waschlösung (PBS/ 1% (w/v) BSA) wurden abermals mit 500 OD₆₀₀-Einheiten von βVtc4-Zellen inkubiert. Nach 45 min Inkubation wurden Überstand und 500 µl Waschlösung vereinigt und 1:2 zur Immunfluoreszenz eingesetzt.

2.2.18. Elektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Proben zur Elektronenmikroskopie wurde von Dr. Heinz Schwarz und Mitarbeitern, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen durchgeführt.

Hefezellen wurden in flüssigem Propan eingefroren (Gefriergerät JFD 030, Bal-Tec, Balzers AG) und in 0.5% Uranylacetat in Ethanol gefriersubstituiert (35 h, -90°C; 4 h, -60°C; 2 h, -50°C; in Gefriersubstitutionsapparatur FSU 010, Bal-Tec, Balzers AG). Die Proben wurden bei -35°C mit Ethanol gewaschen, mit Lowicryl HM20 infiltriert und 48 h mit UV polymerisiert. Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetzchen geladen und im Elektronenmikroskop CM 10 photographiert.

2.2.19. Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

BJ3505 wurden über Nacht in 10 ml YPD angezogen. Die Zellen wurden geerntet (3000 g; 5 min; Raumtemperatur), einmal in 0.5 ml Wasser gewaschen und in 200 μ l Lysepuffer (2% (w/v) Triton X 100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl) aufgenommen. 0.3 g Glaskügelchen und 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurden zugegeben und die Zellen durch heftiges Vortexen (3 min) aufgeschlossen. Anschließend wurde 200 μ l TE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) zugegeben, abermals kurz gevortext und zentrifugiert (20000 g; 5 min; Raumtemperatur). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 1 ml reines Ethanol zugegeben und zentrifugiert (20000 g; 3 min; Raumtemperatur). Das Pellet wurde in 400 μ l TE-Puffer aufgenommen, 30 μ l RNase A (1 mg/ml) zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 μ l 4 M Ammoniumacetat und 1 ml reinem Ethanol ausgefällt und pelletiert (20000 g; 3 min; Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen, die DNA getrocknet und in TE-Puffer zu 1 mg/ml aufgenommen.

2.2.20. PCR

Zur Amplifizierung von genomischer DNA mittels PCR wurden in PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis gemischt:

Wasser	42.3 μ l
10x Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 9.0, 15 mM MgCl ₂ , 1 % (w/v) Triton X 100)	5 μ l
Desoxyribonukleotidgemisch, je 10 mM	1 μ l
Primer 1, 100 μ M	0.5 μ l
Primer 2, 100 μ M	0.5 μ l
genomische DNA, 1 mg/ml	0.5 μ l
Taq-DNA-Polymerase, 5 U/ μ l	0.25 μ l

Die Ansätze wurden im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert:

3 min, 94°C	} 30 Zyklen
1 min, 94°C	
1 min, 51°C	
3 min, 72°C	
10 min, 72°C	

Je 5 μl eines PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht.

2.2.21. Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkten in den Expressionsvektor pCRT7/NT TOPO und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte entsprechend dem Protokoll des pCRT7/NT TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen): 1.8 μl PCR-Produkt wurde mit 0.2 μl durch Topoisomerase I aktiviertem, linearisiertem Vektor 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 0.4 μl TOPO Cloning Stoplösung zugegeben und auf Eis gestellt. Der Ligationsansatz wurde zu 25 μl frisch aufgetauten chemisch kompetenten TOP10F'-One Shot-*E. coli*-Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem 30 sekundigen Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und erneut auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 100 μl SOC-Medium (2% (w/v) Bactopecton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 0.05% (w/v) NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂) wurde für 30 min bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Amp-Platten (1% (w/v) Bactopecton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 2% (w/v) Agar, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, pH 7.0) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden mittels „Colony-PCR“ auf die richtige Insertion der klonierten Gene in den Expressionsvektor untersucht. Dazu wurden als DNA-Vorlage Zellen der entsprechenden Kolonie einem PCR-Ansatz (s. 2.2.20) zugegeben. Als Primer dienten 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3', das mit dem T7-Promotor auf dem Vektor paart, und der jeweilige 3'-Primer des inserierten Gens. Zu Beginn der Reaktion wurde für 10 min auf 96°C erhitzt, um die Zellen aufzuschließen.

2.2.22. Plasmidpräparation

10 ml LB-Amp Medium (1% (w/v) Bactopecton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, pH 7.0) wurden mit Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht bei

37°C und 225 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Übernachtskultur abzentrifugiert (20000g; 2 min; Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A mit 70 U/mg) resuspendiert. Dann wurden 250 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Schließlich wurden 350 µl Puffer P3 (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol, 0.15 % (w/v) Triton X 100, pH 7.0) zugegeben und gemischt. Es wurde zentrifugiert (20000 g; 10 min; 2°C) und der Überstand auf ein QIAprep-Säulchen gegeben. Die Säulchen wurden mit 0.75 ml Puffer PE (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol, pH 7.0) gewaschen und die DNA mit 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) eluiert.

2.2.23. Expression von Fusionsproteinen

Die Expressionsvektoren wurden in Expressionsstämme (BL21(DE3)pLysS für Aut1p, Apg5p, Apg6p, Apg10p, Apg16p; M15 für Cofilin; BL21(DE3) für Twinfilin) transformiert (siehe 2.2.22.) und Transformanten in LB-Amp-Chloramphenicol (1% (w/v) Bactopecton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol, pH 7.0) mit 15 % (w/v) Glycerin bei -80°C eingefroren.

Zur Expression wurden 10 ml-Übernachtskulturen in LB-Amp-Chloramphenicol angelegt und damit morgens 1 l-Kolben angeimpft. Diese wurden bei 37°C und 225 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ 0.6- 0.8 erreichte. Dann wurde mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. 30 min vor und gleichzeitig mit der IPTG-Zugabe wurde PMSF zu 0.2 mM zugegeben. 4 bis 6 h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet.

2.2.24. Reinigung von löslichen His₆-Tag-Fusionsproteinen

Expimierende Zellen (aus 1 l Kultur) wurden geerntet (4000 g; 10 min; 4°C) und in 40 ml Bindepuffer (20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 7.8) aufgenommen. Durch zweimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen mit zwischenzeitlicher Ultraschallbehandlung und Inkubation bei 30°C (zum Verdau der Zellwände durch endogenes Lysozym) wurden die Zellen aufgeschlossen. Unaufgeschlossene Zellen und Zellwände wurden durch Zentrifugation (184000 g; 20 min; 4°C; 50.2 Ti) abgetrennt. Zum Überstand wurden 0.5 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und 30 min bei 4°C rotiert. Die proteinbeladene Matrix wurde in eine PP-Säule gepackt und nacheinander mit 5

ml Bindepuffer und 5 ml Waschpuffer (20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 6.0) gewaschen. Es wurde mit steigenden Imidazolkonzentrationen eluiert (je 1.5 ml 50 mM, 150 mM, 300 mM, 500 mM Imidazol in Waschpuffer). Aut1p eluierte bei 150 mM Imidazol, Apg16p bei 300 mM. Die erhaltenen gereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit überprüft. Im Westernblot mit antiHis₆-Tag-Antikörper wurde die Fusion mit dem His₆-Tag nachgewiesen.

Die gereinigten Proteine (> 1mg/ml) wurden ohne weitere Reinigung zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Zur Koppelung an aktivierte CH-Sepharose wurden sie mittels PD-10 Säulen umgepuffert.

2.2.25. Reinigung von His₆-Tag-Fusionsproteinen aus Einschlußkörperchen

Expimierende Zellen (aus 1 l Kultur) wurden geerntet (4000 g; 10 min; 4°C) und in 40 ml S1 (25% (w/v) Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1% (w/v) Triton X 100, 1 mM PMSF) aufgenommen. Durch einmaliges Einfrieren/ Auftauen, dreimalige Ultraschallbehandlung und 10 min Inkubation bei 30°C wurden die Zellen aufgeschlossen. DTT wurde zu 50 mM (aus 1 M Stammlösung) und EDTA zu 25 mM (aus 500 mM Stammlösung) zugegeben und abermals beschallt. Die Suspension wurde zentrifugiert (30000 g; 30 min; 4°C; SS34) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml S2 (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 1% (w/v) Triton X 100, 1 mM PMSF) durch Ultraschallbehandlung resuspendiert und zentrifugiert (30000 g; 30 min; 4°C; SS34). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml 50 mM Tris pH 8.0, 1% (w/v) Triton X 100 aufgenommen. Der Überstand nach Zentrifugation (30000 g; 30 min; 4°C; SS34) wurde verworfen und das unlösliche Pellet in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 10 mM Tris, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0 aufgenommen (mit Ultraschall resuspendiert, über Nacht bei Raumtemperatur rotiert). Der Überstand nach Zentrifugation (30000 g; 30 min; 4°C; SS34) wurde zur Reinigung an Ni-NTA-Agarose verwendet. Zu dem Überstand wurden 1.5 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die proteinbeladene Matrix wurde in eine PP-Säule gepackt und nacheinander mit 10 ml Bindepuffer (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 10 mM Tris, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.8), 30 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 10 mM Tris, pH 6.3) und 30 ml 50 mM Citrat/NaOH pH 7.0 gewaschen. Die gereinigten

Proteine wurden mit 3 ml 1% SDS, 50 mM Citrat/NaOH pH 4.0 eluiert.

Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Proteinbestimmung gemessen, die Reinheit der Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Vor der Immunisierung von Kaninchen wurden die gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht wurde ausgeschnitten, in DMSO aufgelöst und zur Immunisierung verwendet. Zum Koppeln an aktivierte CH-Sepharose wurden die Proteine ohne weitere Reinigung eingesetzt.

2.2.26. Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Expimierende Zellen (aus 1 l Kultur) wurden geerntet (4000 g; 10 min; 4°C), in PBS (siehe 2.2.14.) gewaschen und in 20 ml PBS, 1% Triton X 100, 0.2 mM PMSF aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschall (4 x 10 s) aufgeschlossen und zentrifugiert (10000 g; 25 min; 4°C; SS34). Der Überstand wurde auf 1 ml in PBS äquilibrierte Glutathion-Sepharose aufgetragen, der Durchlauf verworfen. Die proteinbeladene Matrix wurde gewaschen (10 ml PBS/1% Triton X 100, 40 ml PBS), in 1 ml PBS resuspendiert, 10 U Thrombin zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur sowie 12 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde PMSF zu 1 mM zugegeben. Das abgespaltene Protein wurde durch 7 ml 150 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol eluiert und in Centricon 10 eingengt. Die Proteine wurden unmittelbar nach der Reinigung in die *in vitro*-Autophagocytose eingesetzt; die Inaktivierung des enthaltenen Thrombins durch das zugesetzte PMSF wurde durch die Messung der Thrombinaktivität mittels Chromozym TH (2.2.9.) überprüft. Wurde Twinfilin eingefroren, so fiel ein Teil davon aus und verlor Aktivität.

2.2.27. Kopplung von Proteinen an aktivierte CH-Sepharose

Die aktivierte CH-Sepharose wurde auf der Nutsche mit 200 ml eiskalter 1 mM HCl pro Gramm Matrix gewaschen. Die Matrix quoll dabei auf etwa 3 ml pro Gramm Trockensubstanz an. 2-3 mg zu koppelndes Aut1p bzw. Apg16p pro Milliliter Gelvolumen wurde im dreifachen Gelvolumen an 100 mM NaHCO₃ pH 8.0, 500 mM NaCl verdünnt, die gewaschene CH-Sepharose darin suspendiert und über Nacht bei 4°C rotiert. Aus der Proteinkonzentration des Überstandes wurde die Kopplungseffizienz bestimmt, sie betrug in allen Experimenten >90%. Zum Blockieren aktiver Gruppen der CH-Sepharose wurde 5 M Ethanamin pH 8.0 zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben und eine weitere Stunde bei 4°C rotiert. Die derivatisierte Matrix wurde auf der Nutsche mit 100 mM NaHCO₃ pH 8.0,

500 mM NaCl und dann je dreimal mit 100 mM Tris/HCl pH 8.8/ 500 mM NaCl und mit 200 mM Glycin pH 2.5/ 500 mM NaCl gewaschen, sie wurde bei 4°C in PBS (siehe 2.2.14.) / 0.02% (w/v) Natriumazid aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Matrix in PBS äquilibriert. Für Apg5p, Apg6p und Apg10p wurde das Procedere modifiziert. Sie wurden nach denaturierender Reinigung in SDS gekoppelt. Der pH-Wert der Proteinlösungen (in 1% SDS, 50 mM Citrat/NaOH pH 4.0) wurde mit 10 M NaOH auf 8 eingestellt und NaHCO₃ pH 8.0 zu 150 mM zugegeben. Dann wurde je 1 ml gewaschene aktivierte CH-Sepharose zugegeben und über Nacht bei 4°C gekoppelt. Die Kopplungseffizienz betrug ca. 90%. Die derivatisierte Matrix wurde nacheinander mit 100 mM NaHCO₃ pH 9.4, 500 mM NaCl, mit 200 mM Glycin pH 2.5, 150 mM KCl und mit PBS gewaschen, sie wurde bei 4°C in PBS/ 0.02% (w/v) Natriumazid aufbewahrt.

2.2.28. Immunisierung von Kaninchen, Blutentnahme

Die Immunisierung und Blutentnahme von Kaninchen wurde von Eurogentec, Seraing, Belgien durchgeführt. An den Tagen 1, 14 und 28 wurde mit je 100 µg Antigen immunisiert, gefolgt von monatlichen Injektionen von je 100 µg Antigen. Die erste Immunisierung erfolgte mit Freund's komplettem Adjuvanz, alle folgenden Immunisierungen mit inkomplettem Freund's Adjuvanz. 10 Tage nach der dritten Immunisierung wurden 4 ml und 10 Tage nach allen folgenden Immunisierungen wurden je 40 ml Blut entnommen.

2.2.29. Affinitätsreinigung von Antikörpern

1 ml mit Antigen beladener Sepharose (2-10 mg Protein pro ml Gelbett) wurde in einer 5 ml PP-Säule mit dem zehnfachen Volumen PBS (siehe 2.2.14.) äquilibriert. 10 ml des zu reinigenden Serums wurden mit einem Volumen PBS verdünnt und, falls es immer noch trüb war, filtriert. Diese Lösung wurde dreimal über die Säule gegeben, anschließend die Säule mit zehn Gelvolumina PBS gewaschen und mit 10 ml 0.2 M Glycin/HCl pH 2.5 schnell eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml aufgefangen, sofort mit je 150 µl 1 M Tris/HCl pH 8.8 neutralisiert, in Centricon 30 konzentriert und, falls erwünscht, umgepuffert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Das erhaltene Immunglobulin wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf Reinheit überprüft. Zur Gewinnung von Gesamtimmunglobulinen aus Präimmenserum wurde Protein A-Sepharose an Stelle der mit Antigen beladenen CH-Sepharose verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Niedermolekulare Inhibitoren der *in vitro*-Mikroautophagocytose

Um eine Vorstellung über die für die Mikroautophagocytose benötigten Komponenten zu erhalten, wurde zunächst nach niedermolekularen Inhibitoren der von Sattler und Mayer (2000) beschriebenen *in vitro*-Reaktion gesucht. Dazu wurden Stoffe eingesetzt, die verschiedene Enzymklassen, aber auch Membranstabilität und Membranpotential, beeinflussen. Von insgesamt 48 untersuchten Substanzen konnten 7 die *in vitro*-Autophagocytose nahezu vollständig inhibieren (Tab. 1). Diese 7 Substanzen können nach Wirkmechanismus in fünf verschiedene Klassen aufgeteilt werden: GTP[γ S hemmt G-Proteine, FCCP entkoppelt den Protonengradient an der Vakuolenmembran, Nystatin und Amphotericin B binden an Ergosterole, Rapamycin und K252a hemmen Proteinkinasen, Aristolochiasäure ist ein Hemmstoff der Phospholipase A₂.

Tab. 1. Hemmstoffe der *in vitro*-Autophagocytose

	Eigenschaften	Effekt auf <i>in vitro</i> -Autophagocytose	
		IC50	IC90
GTP[γ S	Hemmung der <i>in vitro</i> -Vakuolenfusion bei 1 mM (Conradt et al., 1994)	200 μ M	1 mM
FCCP	Dissoziation des Membranpotentials isolierter Vakuolen bei 10 μ M (Peters et al., 2001)	1.2 μ M	2 μ M
Nystatin	7 μ M inhibieren Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> (Fryberg et al., 1974)	0.8 μ M	3 μ M
Amphotericin B	gleiche Wirkung und gleiche Potenz wie Nystatin (Bhuiyan et al., 1999)	2 μ M	5 μ M
Rapamycin	Induktion der Makroautophagocytose in Hefekultur bei 0.2 μ M (Noda und Ohsumi, 1998)	20 μ M	40 μ M
K252a	Inhibition hepatischer Autophagocytose mit IC50=30 μ M (Holen et al., 1993)	50 μ M	100 μ M
Aristolochiasäure	Hemmung von Phospholipase A ₂ mit IC50=400 μ M (Rosenthal et al., 1989)	300 μ M	750 μ M

Wurde FCCP mit Valinomycin kombiniert, das Kaliumionen über Membranen transportieren kann, so wurde seine Wirkung noch verstärkt (Abb. 2). Daher wurde in weiteren Experimenten FCCP mit 1 μ M Valinomycin kombiniert eingesetzt.

Da Nystatin und Amphotericin B große chemische Ähnlichkeit und denselben Wirkmechanismus aufweisen (Bhuiyan et al., 1999), wurde in den folgenden Experimenten

ausschließlich Nystatin verwendet. Da es bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen an Aktivität verlor, wurde die Stammlösung regelmäßig frisch angesetzt.

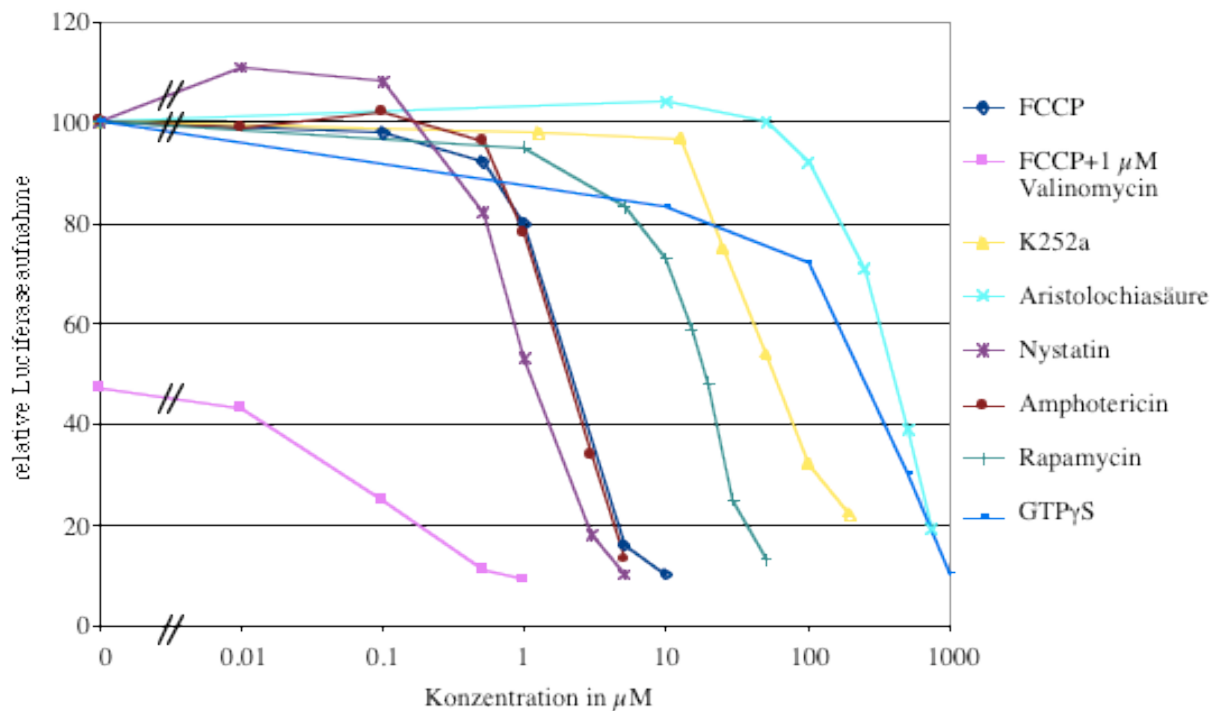


Abb. 2. Titration verschiedener Hemmstoffe der *in vitro*-Autophagocytose.

Verschiedene Hemmstoffe wurden aus 50fachen bis 100fachen Stammlösungen in DMSO zu den angegebenen Konzentrationen in 50 µl-Standardaufnahmereaktionen (siehe 2.2.10.) gegeben. GTPγS wurde aus wässriger Lösung zugegeben; bei FCCP+Valinomycin wurde die Valinomycinkonzentration konstant bei 1 µM gehalten. Nach 1 h Inkubation bei 27° C wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurde der Eiswert (< 5% der maximalen Aufnahme) abgezogen; zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf die ungehemmte Aufnahme (=100) bezogen.

Die hemmende Wirkung der Stoffe aus Tab. 1 war konzentrationsabhängig (Abb. 2). Wurden sie erst nach Ablauf der Aufnahmereaktion zugegeben, so konnten sie das Meßsignal nicht vermindern; sie verhinderten auch nicht die Sedimentation der Vakuolen. Ihre Wirkung war reversibel (siehe Abb. 6). Daraus folgt, daß die Wirkung dieser Hemmstoffe nicht auf einer einfachen Lyse der Vakuolen beruht.

Auf eine Reihe von getesteten Stoffen trafen diese Kriterien nicht zu. Über ihren Einfluß auf die *in vitro*-Autophagocytose kann keine sichere Aussage getroffen werden, weil sie nur in sehr hoher Konzentration einen Einfluß auf die *in vitro*-Autophagocytose ausüben, die Vakuolen zerstören oder anderweitig die Messung beeinflussen (Tab. 2).

Tab. 2. Stoffe, über die keine sichere Aussage bezüglich des Einflusses auf die *in vitro*-Autophagocytose möglich ist.

	Eigenschaften	Effekte auf <i>in vitro</i> -Autophagocytose
Edelfosine	inhibiert phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C mit IC ₅₀ =35 μ M (Berggren et al., 1993)	Hemmt bei 100 μ M die Luciferaseaufnahme um etwa die Hälfte, gleichzeitig werden die Vakuolen lysiert.
Cyclosporin	zyklisches Peptid, hemmt die Peptidyl-Prolyl-Isomeraseaktivität von Cyclophilin mit IC ₅₀ =10 nM (Cardenas et al., 1995)	Hemmt bei 100 μ M die Luciferaseaufnahme um etwa die Hälfte, bei höheren Konzentrationen (1 mM) wird jedoch keine weitere Hemmung erreicht.
Neomycin	Aminoglykosid, bindet an Inositol-Phospholipide; hemmt die <i>in vitro</i> -Vakuolenfusion mit IC ₅₀ =200 μ M (Mayer et al., 2000)	IC ₅₀ =250 μ M, IC ₉₀ =1 mM. Die gewaschenen und pelletierten Vakuolen sind sehr schwer zu resuspendieren; ein Teil der Hemmung wird auch erreicht, wenn Neomycin erst nach der Aufnahmereaktion und unmittelbar vor den Waschschrinen zugegeben wird.
U73122	hemmt Phospholipasen A ₂ und C mit IC ₅₀ =3 μ M (Yule und Williams, 1992)	IC ₅₀ =150 μ M, IC ₉₀ =200 μ M. U73122 enthält eine Maleimidogruppe, über die bei diesen Konzentrationen auch Luciferase gehemmt wird.
Manoalid	hemmt Phospholipase A ₂ mit IC ₉₀ =8 μ M (Lombardo und Dennis, 1985)	IC ₅₀ =5 μ M, IC ₉₀ =100 μ M. Bei dieser Konzentration sedimentiert nur ein kleiner Teil der Vakuolen, der sich nur schwer resuspendieren läßt.
Podophyl- lotoxin	hemmt den Zusammenbau von Mikrotubuli, verhindert Teilung von Säugerzellen mit IC ₅₀ =12 nM (Gupta, 1983)	IC ₅₀ =250 μ M, IC ₉₀ =1 mM. Podophyllotoxin löst sich bei 1 mM nicht vollständig.
Paclitaxel	hemmt den Zusammenbau von Mikrotubuli, verhindert Teilung von Säugerzellen mit IC ₅₀ =100 nM (Gupta, 1983)	IC ₉₀ >0.5 mM. Paclitaxel löst sich bei dieser Konzentration nicht vollständig.
Polymyxin B	inseriert in Phospholipidmembranen, hemmt Proteinkinase C mit IC ₅₀ =10 μ M (Tamaoki et al., 1986)	IC ₉₀ =0.5 mM. Bei dieser Konzentration wirkt Polymyxin B detergentartig.
Staurosporin	Proteinkinaseinhibitor, IC ₅₀ =2.7 nM (Tamaoki et al., 1986)	Hemmt bei 200 μ M die Luciferaseaufnahme um etwa die Hälfte, bei höheren Konzentrationen (1 mM) wird jedoch keine weitere Hemmung erreicht.
F48/80	Calmodulinantagonist, Phospholipaseinhibitor	IC ₉₀ =100 μ M. Diese Hemmung wird jedoch auch erreicht, wenn F48/80 erst nach der Aufnahmereaktion und unmittelbar vor den Waschschrinen zugegeben wird.
Mellitin	amphiphiles Peptid	Lysiert ab 10 μ M die Vakuolen.
Phospho- lipase A ₂		Lysiert die Vakuolen, bevor eine Hemmung erreicht werden kann.
Phenylar- sinoxid	Phosphataseinhibitor	Hemmt die Luciferase durch Bindung an Thiolgruppen.

Eine ganze Reihe von anderen Stoffen zeigte auch bei hohen Konzentrationen keine oder nur eine sehr schwache Hemmung der *in vitro*-Autophagocytose (Tab. 3).

Daraus kann unter Vorbehalten geschlossen werden, daß die durch diese Stoffe gehemmten Proteine an der Mikroautophagocytose nicht beteiligt sind. Das gilt insbesondere für Colchizin und Nocodazol, die in den eingesetzten Konzentrationen die Assemblierung von Mikrotubuli hemmen, aber dennoch keinen Einfluß auf die Luciferaseaufnahme haben. Die Unabhängigkeit der Mikroautophagocytose von Mikrotubuli wird auch durch morphologische Beobachtungen bestätigt (Abb. 3), die zeigen, daß Einstülpungen der Vakuolenmembran räumlich entfernt vom Spindelpolkörper, dem Organisationszentrum der Mikrotubuli, entstehen können.

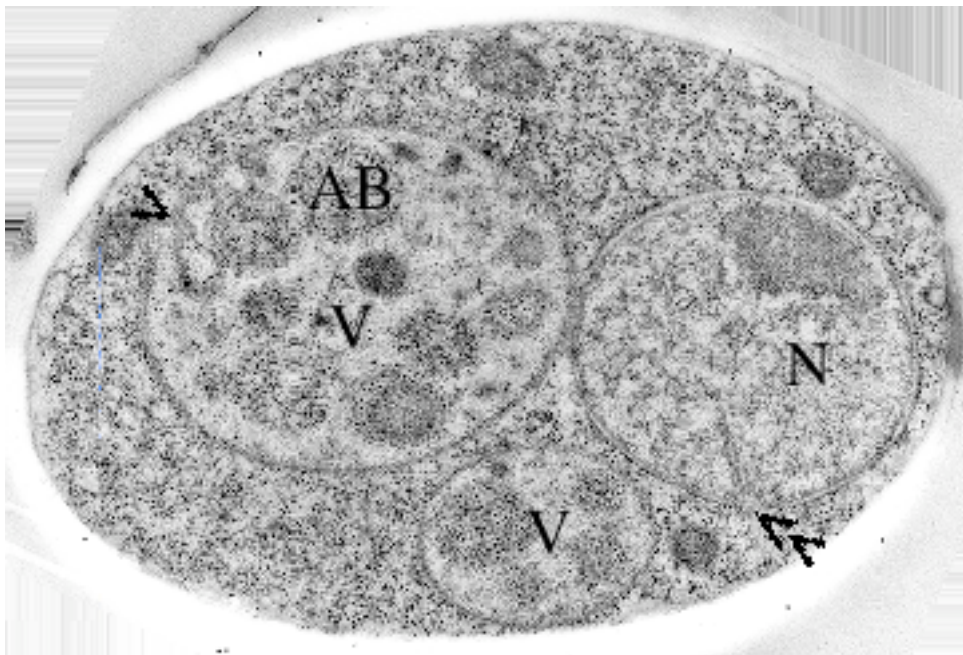


Abb. 3. Einstülpungen der Vakuolenmembran entstehen unabhängig von den vom Spindelpolkörper ausgehenden Mikrotubuli. Dieses elektronenmikroskopische Bild des Dünnschnittes einer Hefezelle (BJ3505, 3 h in SD-N gehungert, in flüssigem Propan schockgefroren, gefriersubstituiert mit 0.5% Uranylacetat in Ethanol, in Lowicryl HM20 eingebettet; 24800x) zeigt eine Einstülpung der Vakuolenmembran (>), die in räumlicher Unabhängigkeit vom Spindelpolkörper (<<) entsteht. Da neben den nukleären auch die cytoplasmatischen Mikrotubuli vom Spindelpolkörper aus organisiert werden (Botstein et al., 1997), spricht dieser Befund gegen eine direkte Beteiligung des Tubulin-Cytosketts an der Mikroautophagocytose. N-Nukleus, V-Vakuole, AB-autophagisches Körperchen.

Tab. 3. Stoffe, die keine Hemmung der *in vitro*-Autophagocytose bewirken

	Eigenschaften	eingesetzt zu
Inositol-1,4,5-trisphosphat	„second messenger“	500 μM
Adenophostin	Inositoltrisphosphatanalogon	50 μM
Diacylglycerolkinase-Inhibitor R59 949	Chinazolinonderivat, hemmt Diacylglycerolkinase mit $\text{IC}_{50}=1 \mu\text{M}$ (de Chaffoy de Courcelles et al., 1989)	200 μM
Farnesyltransferase-Inhibitor	Peptidanalogen, $\text{IC}_{50}=20 \text{ nM}$ (Garcia et al., 1993)	2 mM
Methylarachidonoyl-fluorophosphat	Phospholipase A_2 -Inhibitor, $\text{IC}_{90}=10 \mu\text{M}$ (Schmidt et al., 1999)	500 μM
Perillinsäure	1 mM inhibiert Isoprenylierung von Proteinen in Säugerzellkultur (Crowell et al., 1991)	1 mM
Oleinsäure	bedingt positive Krümmung von Phospholipidmembranen	300 μM *
Myristoyllysophosphatidylcholin	bedingt negative Krümmung von Phospholipidmembranen	100 μM *
Cholesterin	verändert Membranfluidität	2 mM
Colchizin	hemmt den Zusammenbau von Mikrotubuli, verhindert Teilung von Säugerzellen mit $\text{IC}_{50}=175 \text{ nM}$ (Gupta, 1983)	1 mM
Nocodazol	hemmt den Zusammenbau von Mikrotubuli, verhindert Teilung von Säugerzellen mit $\text{IC}_{50}=20 \text{ nM}$ (Gupta, 1983)	200 μM
Coffein	Purinderivat	5 mM
3-Methyladenin	Purinderivat	5 mM
Phorbol-12-myristat-13-acetat	aktiviert Proteinkinase C	1 mM
KN62	Proteinkinaseinhibitor	1 mM **
KT5833	Proteinkinaseinhibitor	500 μM **
H9	Proteinkinaseinhibitor	1 mM **
GDP[S	nicht hydrolysierbares GDP-Analogon	1 mM
NaF	Phosphataseinhibitor	2 mM
Na_3VO_4	Phosphataseinhibitor	200 μM
Natriumpyrophosphat	Phosphataseinhibitor	200 μM
Deltamethrin	Phosphataseinhibitor	1 mM
Cantharidin	Phosphataseinhibitor	1 mM
Microcystin LR	Phosphataseinhibitor, Hemmung der <i>in vitro</i> -Vakuolenfusion bei 15 μM (Conradt et al., 1994)	100 μM
Calyculin A	Phosphataseinhibitor, Hemmung hepatischer Autophagocytose mit $\text{IC}_{50}=50 \text{ nM}$ (Holen et al., 1993)	20 μM
Okadasäure	Phosphataseinhibitor, Hemmung hepatischer Autophagocytose mit $\text{IC}_{50}=10 \text{ nM}$ (Holen et al., 1993)	20 μM

* höhere Konzentrationen lysieren die Vakuolen

** Löslichkeitsgrenze

Die Wirkung der in Tab. 1 vorgestellten Hemmstoffe war abhängig von der Anwesenheit von Cytosol. Auch in Abwesenheit von Cytosol konnte eine, wenn auch weniger effiziente, Aufnahme von Luciferase in die Vakuolen erfolgen. In Abb. 4 b wurde diese cytosolunabhängige Aufnahme gleich 100 gesetzt, obwohl sie absolut gesehen nur etwa 20% der Aufnahme mit Cytosol betrug. Sie war zwar abhängig von ATP, aber nicht empfindlich gegenüber den verwendeten Hemmstoffen (Abb. 4). Da auch Inhibitoren, die wie FCCP bekanntermaßen auf das Membranpotential und nicht auf Proteine wirken, nur in Gegenwart von Cytosol aktiv waren, erscheint es wenig wahrscheinlich, daß alle der eingesetzten Hemmstoffe erst im Komplex mit einem cytosolischen Protein aktiv werden. Vielmehr muß man daraus schließen, daß sich während der Aufnahme von Luciferase sich Prozesse überlagern: Beide sind ATP-abhängig, aber nur der quantitativ dominierende Prozeß ist durch Hemmstoffe beeinflussbar. Der quantitativ weniger bedeutende Prozeß ist nicht empfindlich gegen die verwendeten Hemmstoffe, er läuft parallel zum dominierenden Prozeß ab und stellt möglicherweise die Luciferaseaufnahme einer Subpopulation von Vakuolen dar, die die hemmstoffsensitiven Schritte der Aufnahmereaktion bereits durchlaufen haben.

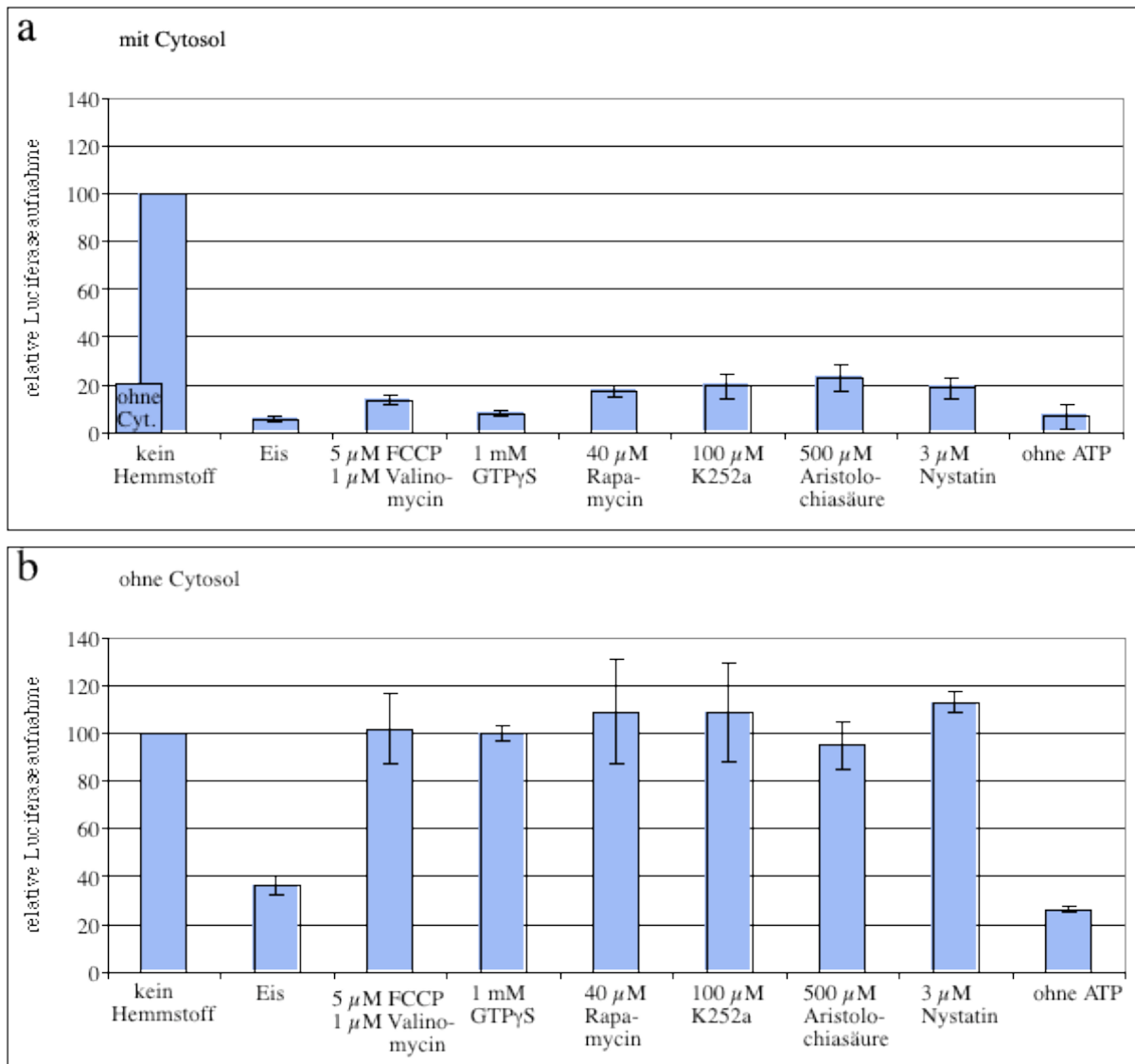


Abb. 4. Abhängigkeit der Hemmstoffwirkung von Cytosol. Standardaufnahmereaktionen (siehe 2.2.10.) wurden **a)** mit Cytosol (3 mg/ml) und **b)** ohne Cytosol durchgeführt. Nach 60 min wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf den Durchschnitt der Kontrollwerte ohne Hemmstoff (=100) bezogen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus vier Experimenten wieder. Die maximale absolute Luciferaseaufnahme betrug ohne Cytosol (**b**) und ohne Hemmstoff etwa 20% der Aufnahme mit Cytosol (**a**).

3.2. Kinetische Analyse der *in vitro*-Autophagocytose

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche Hemmstoffe die *in vitro*-Autophagocytose auf unterschiedlichen Stufen hemmen, wurden Aufnahmereaktionen zunächst ohne Inhibitor gestartet und dann zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion Inhibitor zugegeben (Abb. 5). Hemmstoffe, die nur die ersten Schritte der Aufnahme beeinflussen, sollten nur dann eine

Wirkung zeigen, wenn sie von Beginn der Reaktion an zugegen waren. Stoffe, die die letzten Schritte der Reaktion hemmen, sollten auch dann noch eine weitere Luciferaseaufnahme verhindern, wenn sie zu der schon fortgeschrittenen Reaktion gegeben wurden.

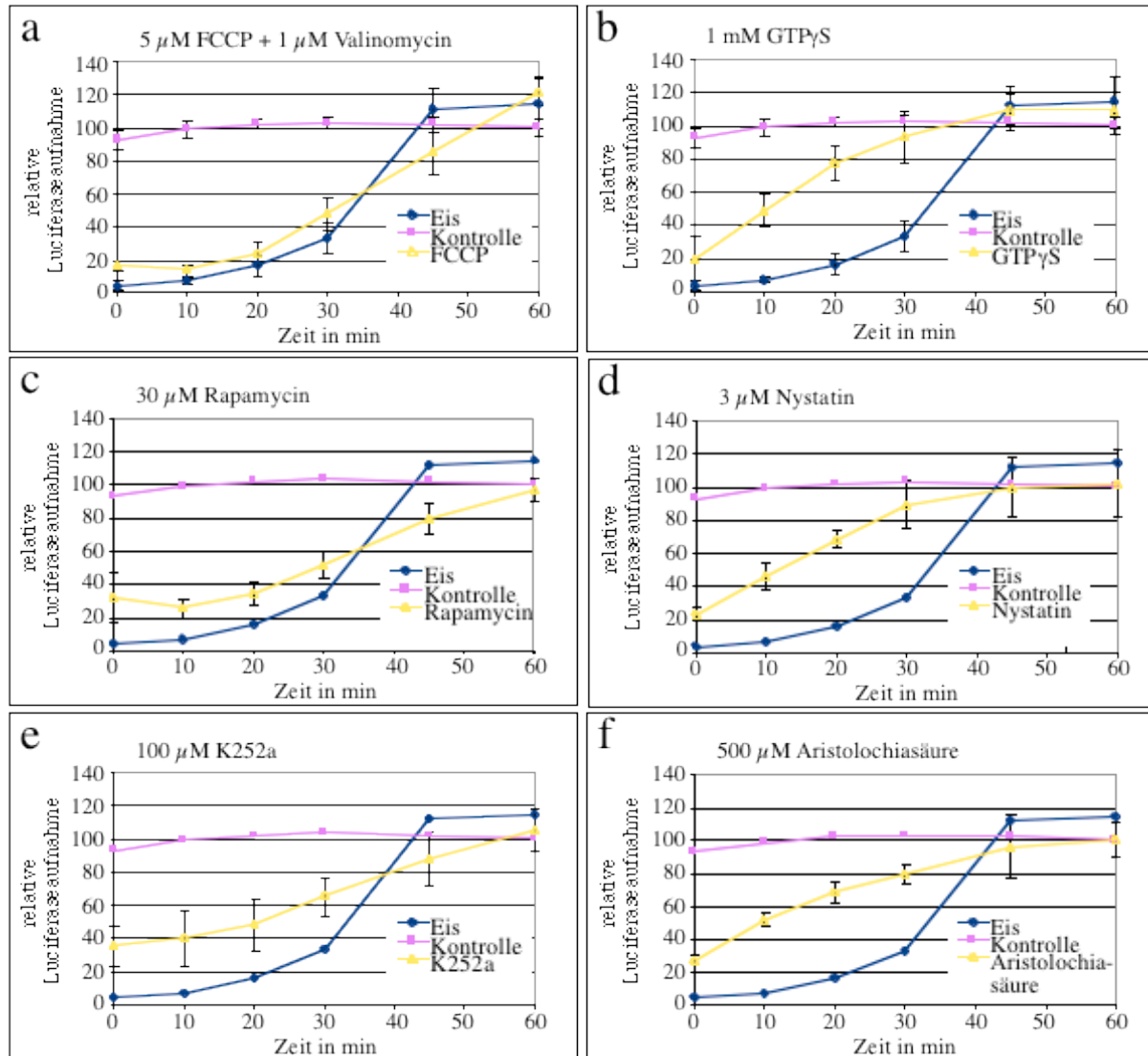


Abb. 5. Kinetiken der Hemmung der *in vitro*-Autophagocytose durch verschiedene Hemmstoffe. Ein Mehrfachreaktionsansatz (siehe 2.2.10.) wurde bei 27° C 1 h lang inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden 50 μl -Aliquots entnommen und dazu die Hemmstoffe aus 50fachen Stammlösungen in DMSO zu den angegebenen Konzentrationen gegeben. Die Aliquots wurden bis zum Ablauf der einstündigen Inkubation weiter bei 27° C inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils ein Aliquot mit DMSO ohne Hemmstoff weiter inkubiert, ein Aliquot wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten auf Eis gestellt. Nach Ablauf von 60 min wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf den Durchschnitt der Kontrollwerte (=100) bezogen, Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten wieder. Zur Orientierung wurden in allen Schaubildern die Kontroll- und Eiskurven eingezeichnet.

Die verwendeten Hemmstoffe lassen sich nach ihrem Verhalten in diesem kinetischen Experiment in mindestens zwei Gruppen einteilen: Bei FCCP/Valinomycin, Rapamycin und K252a ergab sich eine nach oben hin konkave Kurve, die weitgehend parallel zur Eiskurve verlief (Abb. 4, linke Spalte). Diese Stoffe hemmten also während der gesamten Reaktion. Die Kurven für GTP[β], Nystatin und Aristolochiasäure verliefen nach oben konvex (Abb. 4, rechte Spalte), d. h. die hemmende Wirkung dieser Stoffe auf die Luciferaseaufnahme nahm im Verlauf der Reaktion ab. Die Eiskurve, die erhalten wurde, wenn die Reaktionsansätze zu den jeweiligen Zeitpunkten auf Eis gestellt wurden, verlief nach oben konkav und stieg besonders zwischen 30 und 45 min steil an. Der größte Teil der Luciferaseaufnahme schien also in dieser relativ kurzen Zeit erfolgt zu sein. Wurde nach 45 min FCCP/Valinomycin, Rapamycin oder K252a zugegeben, so lag der resultierende Wert noch unter dem entsprechenden Eiswert, die Kurven dieser Inhibitoren kreuzten die Eiskurve. Die Aufnahme während der letzten 15 min der Reaktion wurde also durch diese Hemmstoffe noch gehemmt, durch den Transfer auf Eis jedoch nicht. Das spricht dafür, daß diese Inhibitoren einen Schritt beeinflussten, der durch Abkühlung nicht beeinflusst wurde und der erst am Ende der Reaktion erfolgte. Es ergibt sich hieraus folgende Reihenfolge der Wirkung: 1. GTP[β], Nystatin, Aristolochiasäure; 2. Abkühlen auf Eis; 3. FCCP/Valinomycin, Rapamycin, K252a.

Um die *in vitro*-Autophagocytose mit Hilfe der gefundenen Hemmstoffe in Stufen aufgliedern zu können, wurde zunächst geprüft, ob die Wirkung von Hemmstoffen wieder aufgehoben werden kann. Dazu wurden zweistufige Reaktionen durchgeführt: In einer ersten Inkubation war Hemmstoff zugegen, die Reaktion sollte so auf einer bestimmten Stufe angehalten werden. Dann wurde der Hemmstoff ausgewaschen und die Reaktion entweder durch Transfer auf Eis abgestoppt, mit Hemmstoff oder ohne Hemmstoff weiter inkubiert (Abb. 6). In allen Fällen betrug die Luciferaseaufnahme bei einer zweiten Inkubation ohne Inhibitor ein Vielfaches der Luciferaseaufnahme in der ersten Inkubation. Es ließen sich also alle der verwendeten Hemmstoffe wieder auswaschen, ohne daß die Vakuolen die Fähigkeit zur Luciferaseaufnahme verloren. Die geringe Aufnahme von Luciferase während der ersten 30 min auch in Abwesenheit von Hemmstoffen bei 30°C („keine Hemmung“, Balken 1) bestätigte die schon bei Abb. 5 gemachte Beobachtung, daß der Hauptteil der Luciferase erst aufgenommen werden konnte, wenn die Vakuolen mindestens 30 min unter geeigneten Bedingungen vorinkubiert worden waren.

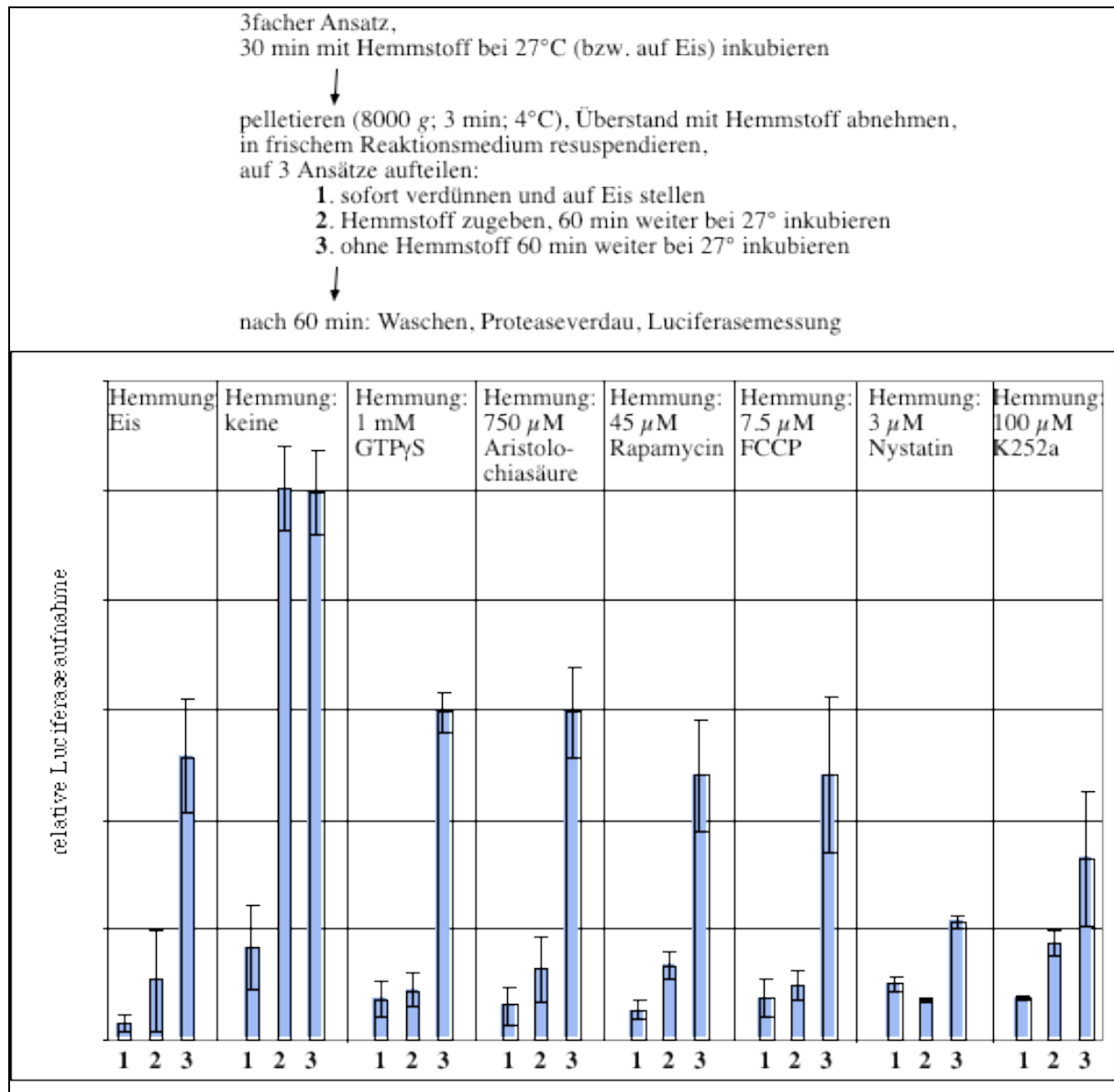


Abb. 6. Reversibilität der Wirkung von Hemmstoffen. Um zu überprüfen, ob die Wirkung der verwendeten Hemmstoffe reversibel sei, wurden zweistufige Reaktionen durchgeführt. In der ersten Stufe wurden Vakuolen in komplettem Reaktionsmix mit dem angegebenen Hemmstoff bei 27°C (bzw. auf Eis) inkubiert (siehe 2.2.10.). Nach 30 min wurden die Vakuolen durch Zentrifugation bei 4°C reisoliert, in frischem Reaktionsmix aufgenommen und auf drei Aliquots à 50 μl aufgeteilt. Ein Aliquot wurde sofort verdünnt und auf Eis gestellt, es diente der Messung der Luciferaseaufnahme während der ersten 30 min (1). Einem zweiten Aliquot wurde Hemmstoff zugegeben und für weitere 60 min inkubiert, hier war also während der gesamten Inkubation Hemmstoff zugegen (2). Ein drittes Aliquot schließlich wurde ohne Hemmstoff für weitere 60 min bei 27° C inkubiert und diente der Messung der Luciferaseaufnahme, die nach dem Aufheben einer durch Hemmstoffe bedingten Blockade noch stattfinden konnte (3). Nach der zweiten Inkubation, also nach insgesamt 90 min, wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Alle Werte wurden auf die durchschnittliche Luciferaseaufnahme, die ohne Blockade durch einen Hemmstoff nach 90 min bei 27°C erreicht wurde, bezogen (keine Hemmung=100). Fehlerbalken geben Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten wieder.

Diese zweistufige Reaktion wurde nun verwendet, um zu prüfen, ob die Empfindlichkeit gegen einige der Hemmstoffe während der Vorinkubation mit einem anderen Hemmstoff verloren geht (Abb. 7). Es ließ sich jedoch auf diese Art keine stufenweise Abfolge der Reaktion festlegen: Alle Hemmstoffe zeigten in der zweiten Inkubation noch Wirkung, unabhängig von dem in der ersten Inkubation gegenwärtigen Hemmstoff. Selbst wenn in der ersten Inkubation kein Hemmstoff zugegen war, entstand keine Resistenz gegenüber GTP[β], Nystatin oder Aristolochiasäure. Eine solche Resistenz war jedoch beobachtet worden, wenn diese Inhibitoren nach 30 min in eine laufende Reaktion gegeben wurden (Abb. 5).

Offensichtlich war der Zustand, in dem die Vakuolen resistent gegen diese Hemmstoffe waren, labil und wurde durch das Reisolieren der Vakuolen gestört. Dadurch konnten GTP[β], Nystatin und Aristolochiasäure in einer zweistufigen Reaktion wirken, obwohl sie bei Zugabe zu nicht isolierten Vakuolen nach 30 min Vorinkubation kaum noch Wirkung zeigten.

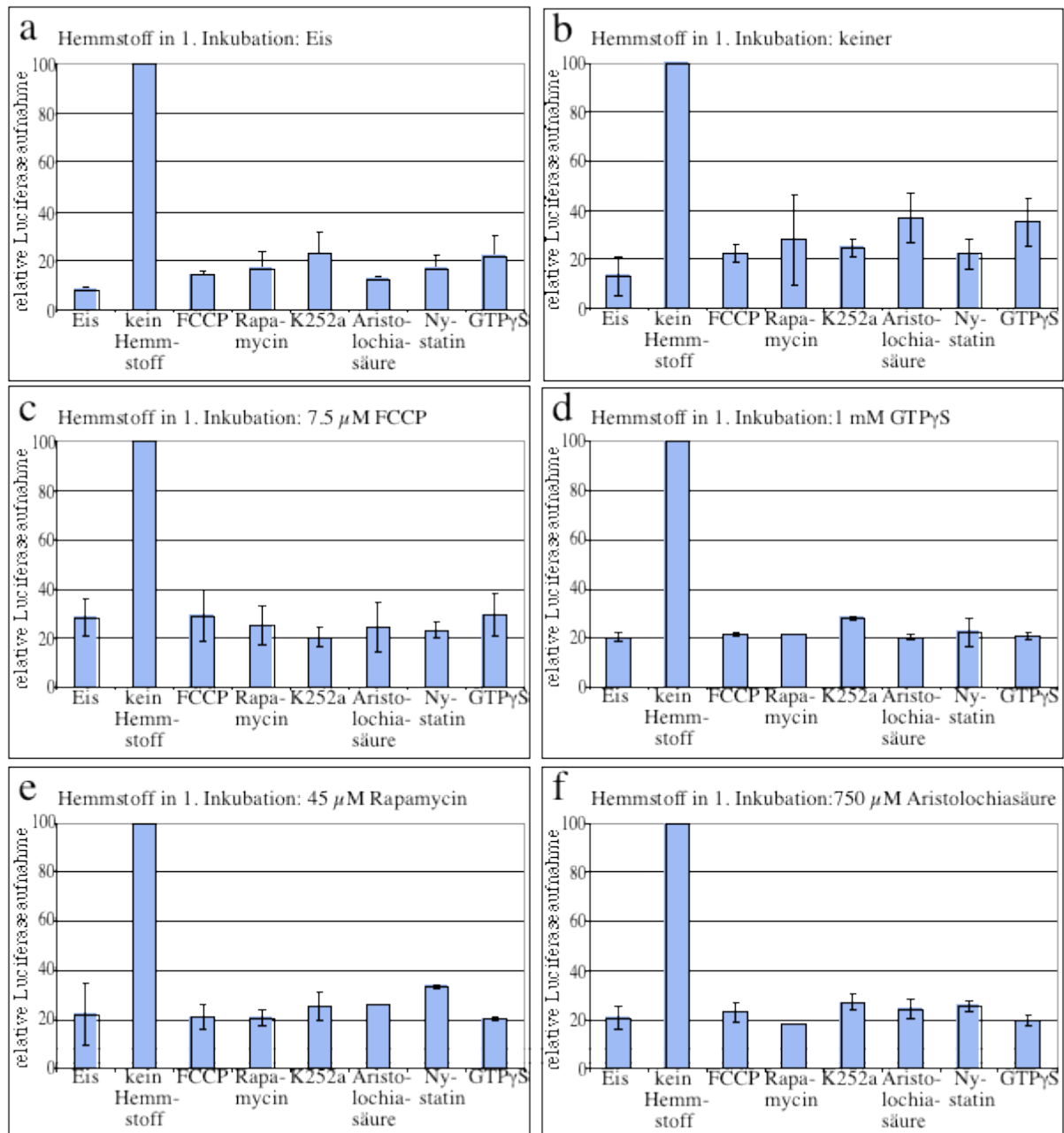


Abb. 7. Wirkung von Hemmstoffen nach reversibler Blockade. Zweistufige Reaktionen wurden wie in Abb. 6 beschrieben durchgeführt. Nach Entfernung des Hemmstoffes der ersten Stufe wurde jeder Ansatz auf 8 Aliquots aufgeteilt und in der 2. Inkubation verschiedene Hemmstoffe (7.5 μM FCCCP, 45 μM Rapamycin, 100 μM K252a, 750 μM Aristolochiasäure, 3 μM Nystatin, 1 mM GTPγS) zugegeben. Als Kontrolle dienten Aliquots, die nach dem Reisolieren bei 27°C bzw. auf Eis ohne Hemmstoff weiter inkubiert wurden. Nach der zweiten Inkubation, also nach insgesamt 30 min + 60 min, wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf den Durchschnitt der Kontrollwerte ohne Hemmstoff in der zweiten Inkubation (=100) bezogen. Fehlerbalken geben Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten wieder.

Die Ergebnisse der Kinetiken in Abb. 5 legen nahe, daß der Transfer auf Eis die Luciferaseaufnahme nicht vollständig verhindern kann, wenn die Vakuolen zuvor bei 27°C inkubiert worden waren. Um das näher zu untersuchen, wurde parallel zu einer vollständigen Aufnahmereaktion ein Ansatz ohne Luciferase inkubiert. Diese Ansätze wurden nach 60 min auf Eis gekühlt und Luciferase zugegeben. Unmittelbar danach wurden die Vakuolen gewaschen und die in kurzer Zeit auf Eis aufgenommene Luciferase gemessen; sie betrug etwa 40% der Luciferase, die über 60 min bei 27°C aufgenommen worden war (Abb. 8 a) und ein Vielfaches der im Kontrollansatz aufgenommenen Luciferase. Der Kontrollansatz war über 60 min auf Eis gestanden und hatte danach Luciferase erhalten. Ein großer Teil der Luciferaseaufnahme konnte also in kürzester Zeit auf Eis erfolgen, wenn die Vakuolen entsprechend vorbereitet waren. Um sicher zu stellen, daß dieser Effekt nicht auf Luciferase beschränkt war, wurde dasselbe Experiment mit Meerrettichperoxidase durchgeführt (Abb. 8 b). Es ergab sich kein Unterschied zum Verhalten der Luciferase.

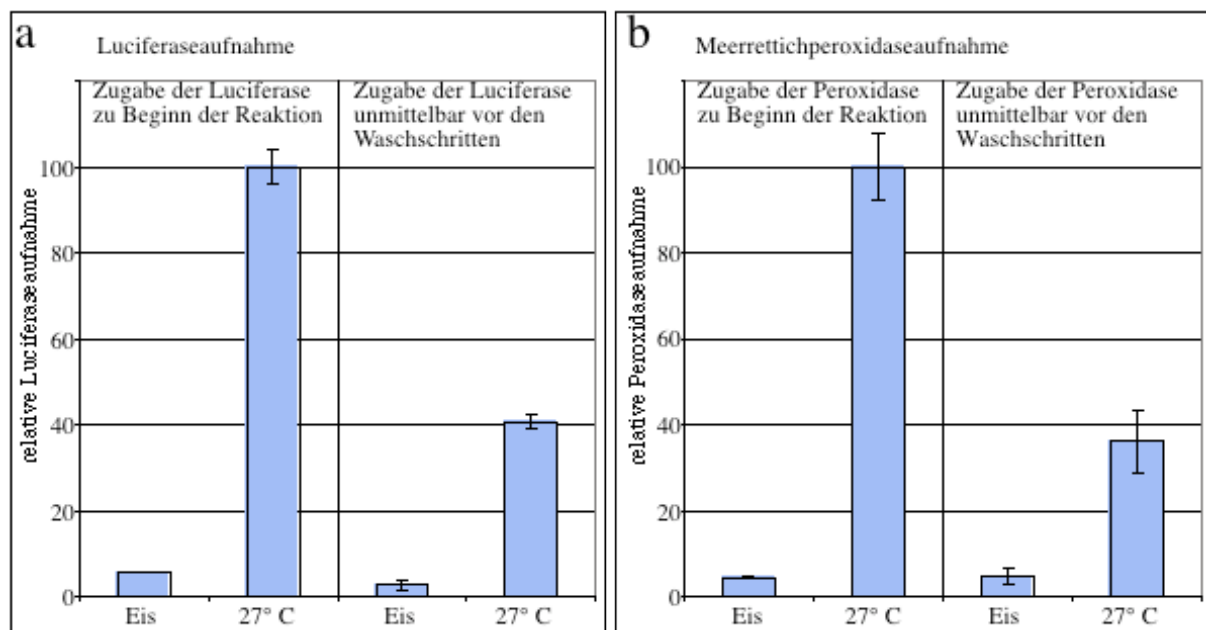


Abb. 8. „Schnelle“ Aufnahme nach Vorinkubation der Vakuolen.

a) links: Standardaufnahmereaktionen mit Luciferase (siehe 2.2.10.) wurden für 60 min auf Eis bzw. bei 27° inkubiert. **rechts:** Standardaufnahmereaktionen ohne Luciferase wurden für 60 min auf Eis bzw. bei 27° inkubiert. Nach 60 min wurden die Ansätze auf Eis gestellt und Luciferase zugegeben. Die Vakuolen wurden wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf die maximale Aufnahme (=100) bezogen. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von Doppelbestimmungen an.

b) Dasselbe Experiment wie in a) wurde mit der Messung der Aufnahme von Meerrettichperoxidase anstelle von Luciferase durchgeführt.

Diese überraschende „schnelle“ Aufnahme ließ sich kinetisch nicht auflösen: Sobald Luciferase zugegeben und gemischt worden war, erreichte die Aufnahme schon ihr Maximum. Die Höhe des „schnell“ aufgenommenen Luciferaseanteiles schwankte zwischen 20 und 80% der gesamten Aufnahme, je nach verwendeter Vakuolenpräparation. Innerhalb ein und desselben Experimentes war dieser Anteil jedoch konstant, die in Abb. 8 gezeigten 40% können als typisch gelten. Dieser Anteil hing nicht wesentlich von der Konzentration der Vakuolen ab (Abb. 9) und wurde durch hohe Konzentrationen an BSA (ab 30 mg/ml) vermindert, aber nicht vollständig aufgehoben (nicht gezeigt).

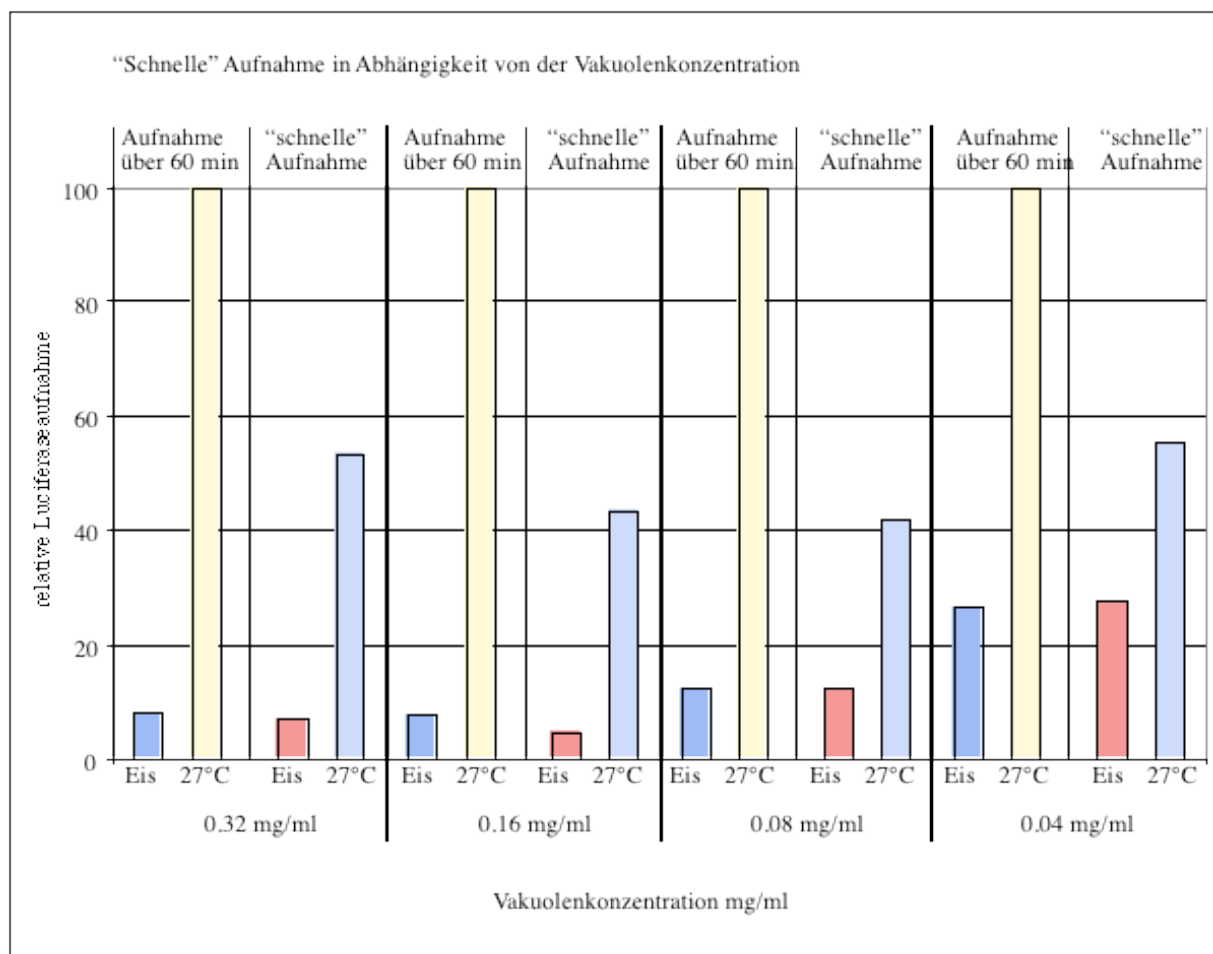


Abb. 9. Die „schnelle“ Aufnahme ist unabhängig von der Vakuolenkonzentration. 100 μ l- Aufnahmereaktionen (siehe 2.2.10.) mit den angegebenen Vakuolenkonzentrationen wurden für 60 min auf Eis bzw. bei 27° inkubiert. Luciferase wurde entweder vor ("Aufnahme über 60 min") oder nach ("schnelle" Aufnahme) der Inkubation zugegeben. Die Vakuolen wurden wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf die jeweilige maximale Aufnahme (=100) bezogen.

Um für die „schnelle“ Aufnahme kompetent zu werden, mußten die Vakuolen vorinkubiert werden. Diese Vorbereitung zeigte dieselben Abhängigkeiten wie die Aufnahme von Luciferase über 60 min: Sie erfolgte nur in Gegenwart von ATP und Cytosol und sie war sensitiv gegenüber FCCP/Valinomycin, K252a, Aristolochiasäure, Nystatin, Rapamycin und GTP γ S (Abb. 10 a). Wurden dagegen die genannten Hemmstoffe erst nach der Vorinkubation und direkt vor der Luciferase zugegeben (Abb. 10 b), so wirkten sie zum Teil nicht mehr (FCCP/Valinomycin, GTP γ S, Nystatin) oder abgeschwächt (K252a, Rapamycin).

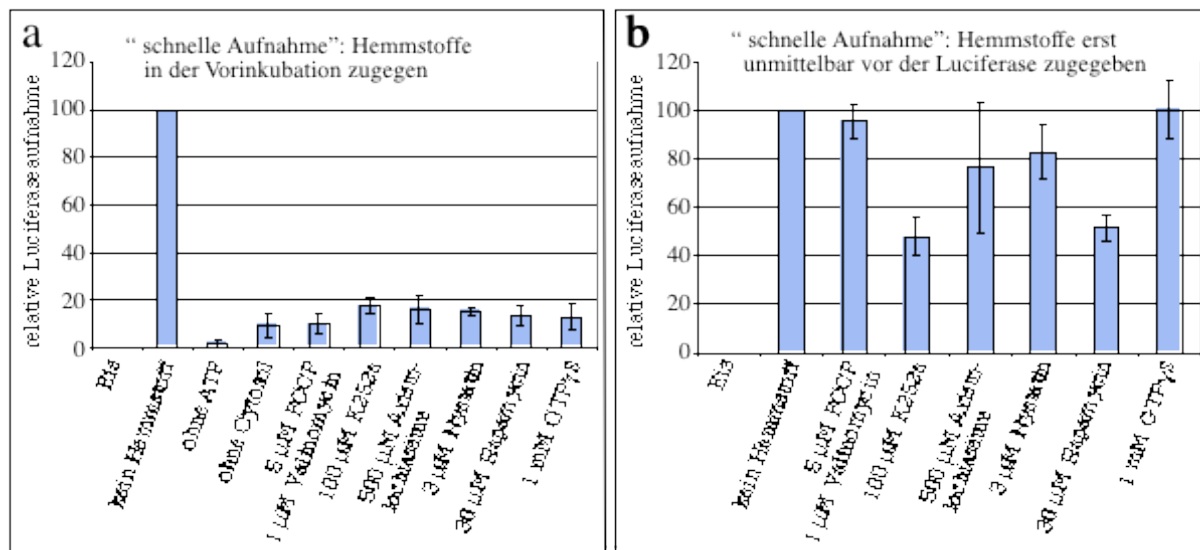


Abb. 10. Abhängigkeit der „schnellen Aufnahme“ von Hemmstoffen.

a) 50 μ l Aufnahmereaktionen (siehe 2.2.10.) ohne Luciferase wurden mit den angegebenen Hemmstoffen inkubiert, nach 60 min wurde Luciferase zugegeben, gemischt und die Ansätze verdünnt. Parallel wurden auch Ansätze ohne ATP und ohne Cytosol durchgeführt.

b) 50 μ l Aufnahmereaktionen ohne Luciferase wurden ohne Hemmstoffe inkubiert. Nach 60 min wurden die angegebenen Hemmstoffe zugegeben, gemischt, 2 min inkubiert, dann Luciferase zugegeben, abermals gemischt und die Ansätze verdünnt.

Die Vakuolen wurden wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden die Eiswerte (< 10% der ungehemmten Luciferaseaufnahme) abgezogen und alle Werte auf den Durchschnitt der Werte ohne Hemmstoff (=100) bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von zwei Experimenten mit Doppelbestimmung wieder.

Um die Anforderungen der „schnellen“ Aufnahme an das Reaktionsmedium nach erfolgter Vorinkubation zu bestimmen, wurden Vakuolen ohne Luciferase, aber im ansonsten kompletten Reaktionsmix bei 27°C vorinkubiert, zentrifugiert und in unterschiedlichen Puffern resuspendiert. Dann wurde Luciferase zugegeben und die „schnelle“ Aufnahme gemessen. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der auf Eis statt bei 27°C vorinkubiert worden war (Abb. 11). Wurde in komplettem Reaktionsmix resuspendiert, so war die Aufnahme etwas

geringer, als wenn im Überstand nach der Zentrifugation resuspendiert wurde. Möglicherweise spielten also Veränderungen, die sich im Puffer während der Vorinkubation ereigneten, eine gewisse Rolle. Wurde in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol resuspendiert, so erhielt man eine zwar variable, aber dennoch deutliche Luciferaseaufnahme. Die Vorinkubation zur „schnellen“ Aufnahme benötigte also ATP und Cytosol, die eigentliche Aufnahmereaktion jedoch nicht mehr bzw. die nach dem Reisolieren verbleibenden geringen Konzentrationen an ATP und Cytosol genügten. Überraschenderweise ging die Aufnahmekompetenz der vorinkubierten Vakuolen vollständig verloren, wenn die Vakuolen zunächst in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol resuspendiert wurden und dann der komplette Reaktionsmix mit ATP, Cytosol und Salzen zugegeben wurde. Der kompetente Zustand war also gegen Reisolierung durch Zentrifugation und Resuspendieren stabil, aber labil bei Änderungen der Zusammensetzung des Puffers.

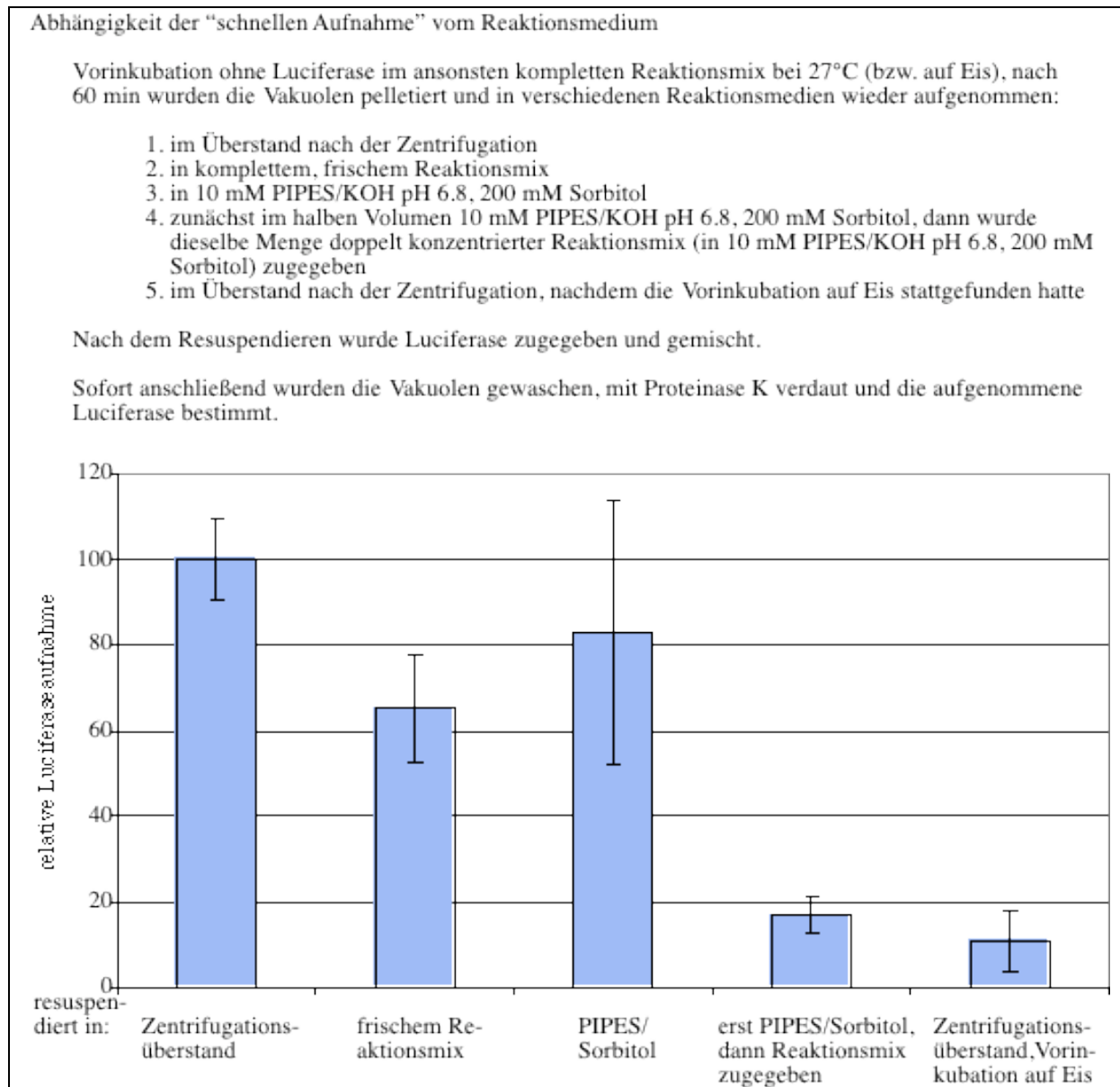


Abb. 11. Abhängigkeit der „schnellen Aufnahme“ vom Medium. Aufnahmereaktionen (siehe 2.2.10.) ohne Luciferase wurden bei 27° C inkubiert. Nach 60 min wurden die Vakuolen pelletiert und in verschiedenen Medien resuspendiert. Dann wurde Luciferase zugegeben und gemischt. Die Vakuolen wurden wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf den Durchschnitt derer bezogen, die in dem Überstand nach Zentrifugation erreicht wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus 4 Experimenten mit Doppelbestimmung wieder.

Die Fähigkeit der Vakuolen zur schnellen Aufnahme von Luciferase bildete sich während der Vorinkubation mit derselben Kinetik wie die Aufnahme selbst. Wurden Reaktionsansätze ohne Luciferase inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten Luciferase zugegeben und die Ansätze anschließend direkt auf Eis gestellt, so unterschied sich die Form der erhaltenen Eiskurve nicht von der in Abb. 5 dargestellten (nicht gezeigt).

Da die „schnelle“ Aufnahme Eigenschaften einer unspezifischen Bindung (Geschwindigkeit, fehlende Sättigung) von Luciferase an die Vakuolenmembran zeigte, wurde der tatsächliche Eintransport von Luciferase in die Vakuole durch proteolytischen Abbau innerhalb der Vakuole (Abb. 12 a) nachgewiesen. Die „schnell“ aufgenommene Luciferase unterschied sich nicht von der über 60 min aufgenommenen: Beide wurden innerhalb der Vakuole abgebaut; wurden die Vakuolen lysiert und somit die intravakuolären Hydrolasen verdünnt und in ein ungünstiges Medium überführt, fand kaum noch Luciferaseabbau statt. Proteaseinhibitoren schützten die Luciferase weiter vor dem Abbau. Der gesamte Verlust an Luciferaseaktivität fand innerhalb von 30 min nach Beginn des Abbaus mit einer Halbwertszeit von etwa 5 min (nicht gezeigt) statt, möglicherweise repräsentiert die nach 30 min verbleibende Luciferaseaktivität eine verkürzte, proteasestabile, minder aktive Form der Luciferase.

Gegen Verdau durch Proteinase K war die in die Vakuole aufgenommene Luciferase geschützt, egal ob sie über 60 min oder schnell aufgenommen worden war (Abb. 12 b): 20-40% der Luciferase waren sensitiv gegenüber schon kleinen Konzentrationen von Proteinase K, der Rest war gegen Konzentrationen bis zu 6 mg/ml resistent.

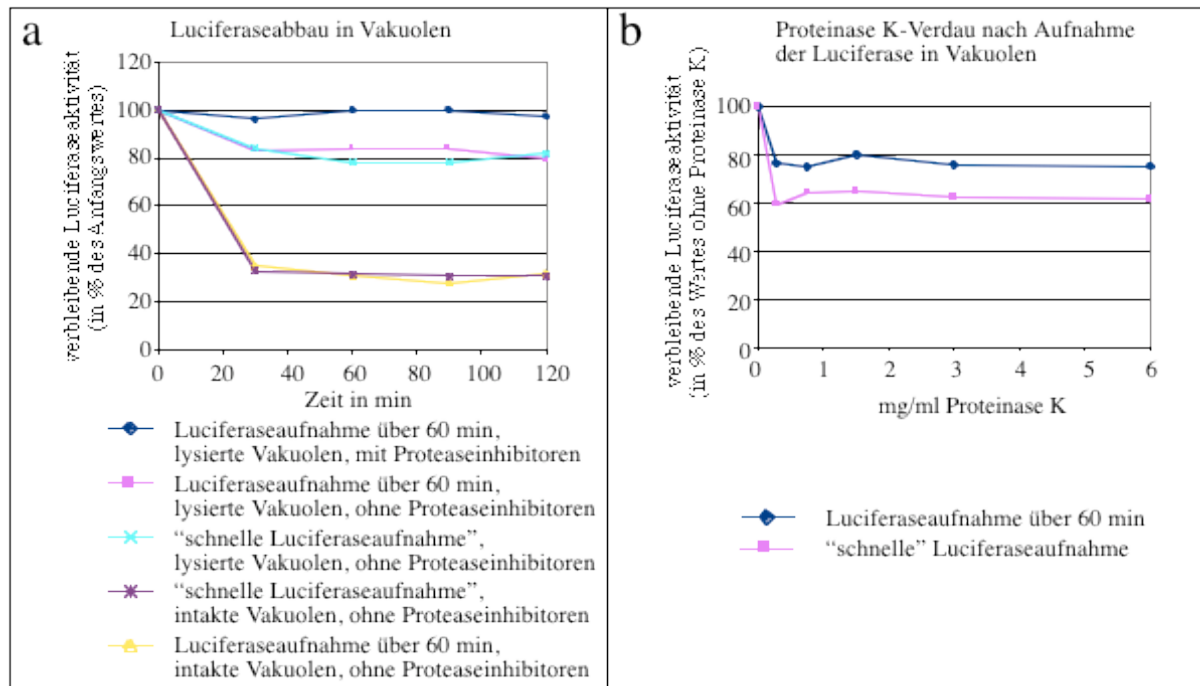


Abb. 12. Schnell aufgenommene Luciferase läßt sich nicht von der über 60 min aufgenommenen Luciferase unterscheiden.

a) Luciferase wurde entweder während einer 60 minütigen Inkubation oder während ca. 1 min nach einer 60 minütigen Inkubation aufgenommen (vgl. Abb. 8). Während dieser Zeit war kein Proteaseinhibitor zugegen. Die Vakuolen wurden durch Flotation reisoliert: Je 300 μ l Reaktionsansatz in 2 ml-Reaktionsgefäßen wurden mit 200 μ l 30% Ficoll in 10 mM PIPES/KOH pH 6,8, 200 mM Sorbitol, 150 mM KCl gemischt, nacheinander mit 400 μ l 10% Ficoll, 1 ml 8% Ficoll und 200 μ l 0% Ficoll im selben Puffer überschichtet und im Ausschwingrotor zentrifugiert (10000 g; 5 min; 4°C). Die Vakuolen wurden von der 8%/0% Grenzschicht abgenommen und entweder direkt in 350 μ l Puffer A (90 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6,8, 200 mM Sorbitol, 0,5 mM Mg-ATP, 20 mM Creatinphosphat, 125 μ g/ml Creatinkinase, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA) aufgenommen oder zunächst osmotisch lysiert. Für die osmotische Lyse wurden die Vakuolen in Wasser aufgenommen, 5 min auf Eis gestellt und dann 6fach konzentrierter Puffer A zu der genannten Konzentration zugegeben. Das Maß der Lyse wurde mikroskopisch kontrolliert. Einem Ansatz wurden während der Lyse Proteaseinhibitoren zugegeben (1 mM PMSF, 0,2 mM Pefabloc, 1 mM o-Phenanthrolin, 1 μ g/ml Pepstatin A). Die Ansätze wurden bei 30° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben à 50 μ l gezogen, Proteaseinhibitoren zugegeben und auf Eis gestellt. Nach dem Ende der Inkubation wurde die Luciferaseaktivität der einzelnen Proben bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf den Anfangswert (=100) bezogen.

b) Luciferase wurde entweder während einer 60 minütigen Inkubation oder während ca. 1 min nach einer 60 minütigen Inkubation aufgenommen (vgl. Abb. 8). Die Vakuolen wurden wie unter a) beschrieben durch Flotation reisoliert und ad 0,2 mg/ml in 10 mM PIPES/KOH pH 6,8, 200 mM Sorbitol, 150 mM KCl aufgenommen. Je 50 μ l wurden mit Proteinase K in den angegebenen Konzentrationen 15 min auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen des Verdaus wurden jeweils 50 μ l 1 mM PMSF, 0,2 mM Pefabloc in 10 mM PIPES/KOH pH 6,8, 200 mM Sorbitol, 150 mM KCl zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Luciferaseaktivität in den einzelnen Proben wurde bestimmt und zur graphischen Darstellung auf den Wert ohne Proteasezugabe (=100) bezogen.

3.3. Rolle von Actin in der Mikroautophagocytose

Die Einstülpungen von Membranen, wie sie für die Mikroautophagocytose typisch sind, sind ohne Beteiligung des Cytoskeletts schwer vorstellbar. Eine Rolle von Mikrotubuli ist durch pharmakologische (Tab. 3) und morphologische (Abb. 3) Beobachtungen wenig wahrscheinlich; die Möglichkeit einer Beteiligung von Actin wurde zunächst pharmakologisch überprüft. Es wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren der Actinassemblierung auf die *in vitro*-Autophagocytose gemessen (Abb. 13)

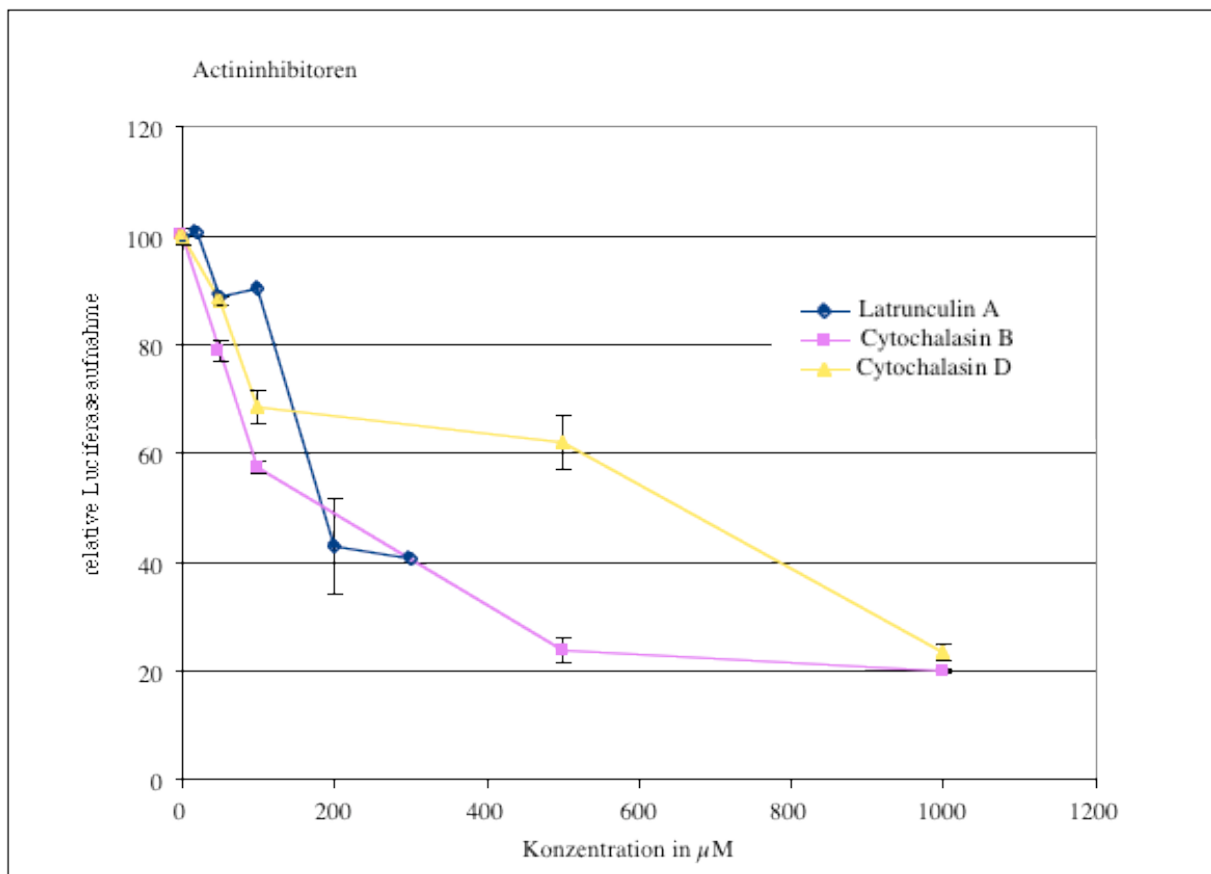


Abb. 13. Titration verschiedener Actinhemmstoffe.

Zu 50 μl -Standardaufnahmereaktionen (siehe 2.2.10.) wurden verschiedene Hemmstoffe aus 50fachen bis 100fachen Stammlösungen in DMSO zu den angegebenen Konzentrationen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 27° C wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurde der Eiswert (< 5% der maximalen Aufnahme) abgezogen; zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf die ungehemmte Aufnahme (=100) bezogen. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von Doppelbestimmungen wieder; der Fehlerbalken bei 200 μM Latrunculin A gibt die Standardabweichung von vier verschiedenen Experimenten wieder.

Alle der verwendeten Hemmstoffe (Latrunculin A, Cytochalasin B, Cytochalasin D) hemmten die Mikroautophagocytose, wenn auch in verhältnismäßig hohen Konzentrationen: Die

Polymerisierung von isoliertem Actin wird schon durch äquimolare Mengen Latrunculin A verhindert. Im Reaktionsansatz mit 3 mg/ml cytosolischem Protein liegt Actin, wird ein Anteil von etwa 1% (w/w) an dem verwendeten Cytosolextrakt zugrunde gelegt, in einer Konzentration im Bereich von 1 μ M vor. Bei den zur Hemmung der *in vitro*-Mikroautophagocytose nötigen Konzentrationen liegt Latrunculin A also im Überschuß gegenüber Actin vor. Ähnliches gilt für das Wachstum von Hefen in Kultur: Es wird durch 100 μ M Latrunculin A gehemmt (Ayscough et al., 1997). Mögliche Ursachen für die hohen Konzentrationen, die für die Hemmung der *in vitro*-Autophagocytose durch Actingifte benötigt werden, sind die hohe Proteinkonzentration im Reaktionsgemisch und die Beteiligung von hochaffinen Actinbindungsstellen an der Vakuolenmembran.

Als weitere das Actincytoskelett beeinflussende Stoffe wurden rekombinant hergestelltes Cofilin und Twinfilin eingesetzt. Cofilin fördert die Dynamik von Actinfilamenten, indem es sowohl den Auf- als auch den Abbau beschleunigt (Lappalainen et al., 1997). Twinfilin besteht aus zwei Cofilin-homologen Domänen und bindet Actinmonomere, ohne ihren Einbau in Filamente zu fördern. Dadurch verhindert es die Polymerisierung von Actin und verursacht, wenn es im Überschuß gegenüber Actin vorliegt, die Depolymerisierung von Actinfilamenten (Goode et al., 1998). Beide Proteine wurden als GST-Fusionsproteine aus *E. coli* gereinigt und das GST-Tag proteolytisch abgespalten (Abb. 14 a, b). Die gereinigten Proteine wurden in die *in vitro*-Autophagocytose eingesetzt (Abb. 14 c). Während Cofilin keine Hemmung der *in vitro*-Autophagocytose bewirkte, hemmte Twinfilin die Luciferaseaufnahme. Die Bildung von Actinfilamenten wird also für die Mikroautophagocytose benötigt.

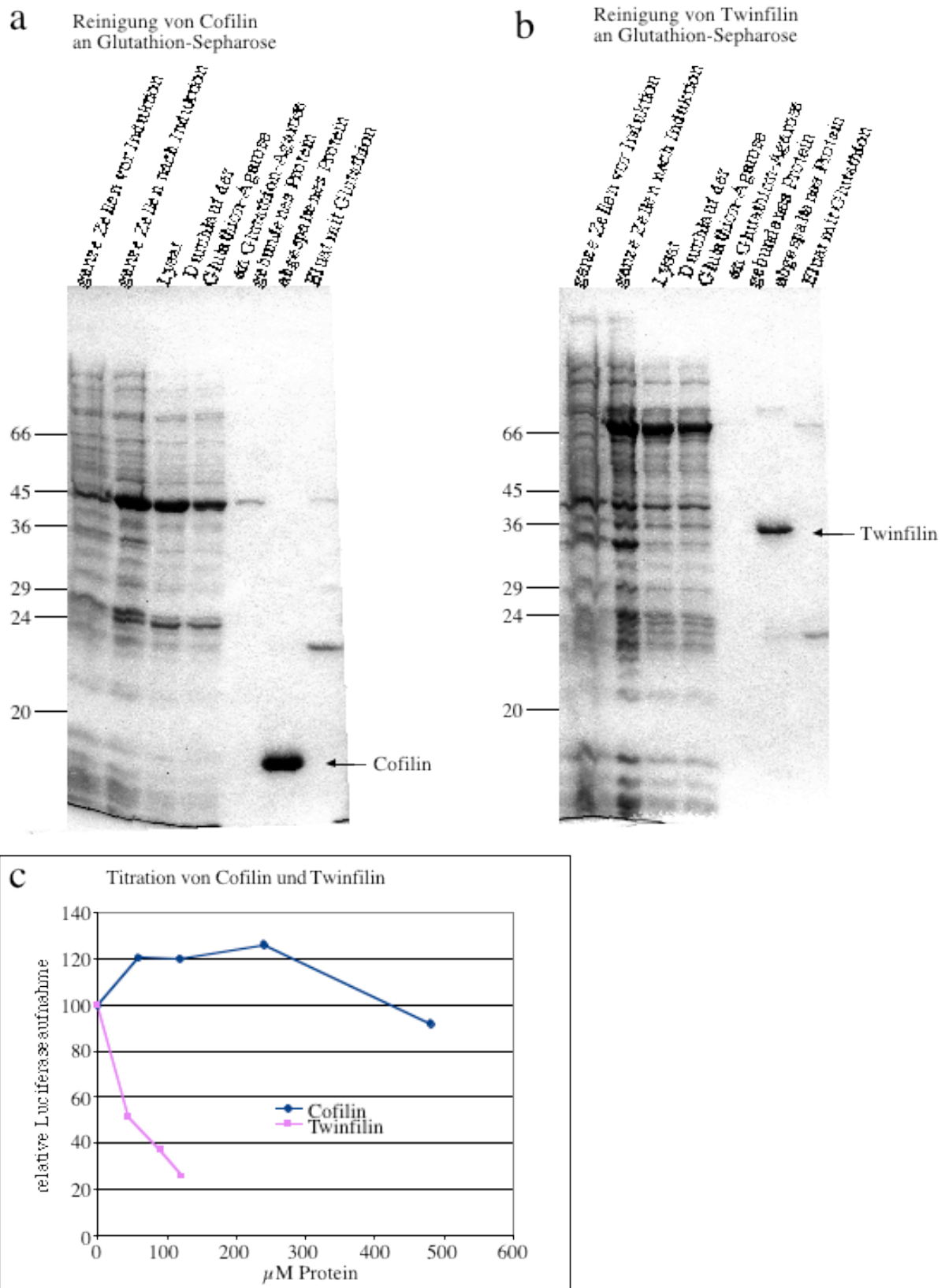


Abb. 14. Einfluß von Cofilin und Twinfilin auf die *in vitro*-Autophagocytose.

a, b) Fusionsproteine von Glutathion-S-Transferase mit Cofilin (a) bzw. Twinfilin (b) wurden in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose adsorbiert (2.2.23., 2.2.26.). Nach dem Wegwaschen verunreinigender Proteine wurden Cofilin bzw. Twinfilin durch limitierte

Wenn Actin für die Mikroautophagocytose wichtig ist, so sollte es während der *in vitro*-Reaktion mit der Vakuole interagieren. Um eine solche Bindung nachzuweisen, wurden Vakuolen aus Standardreaktionsansätzen (siehe 2.2.10.) reisoliert und Actin mittels Western Blot nachgewiesen. Zum Vergleich dienten Vakuolen, deren Protein direkt nach der Isolierung gefällt worden war und Ansätze ohne ATP bzw. mit Cytochalasin B, GTP γ S, FCCP/Valinomycin (Abb. 15). Wurden Vakuolen ohne Inhibitor bei 27°C inkubiert, so vervielfachte sich ihr Actinbestand gegenüber den frisch isolierten Vakuolen. Bei Mangel an ATP und in Gegenwart von GTP γ S, FCCP/Valinomycin oder Cytochalasin B wurde nicht nur diese Zunahme des vakuolären Actins verhindert, sondern es ging auch das an den frisch isolierten Vakuolen vorhandene Actin verloren.

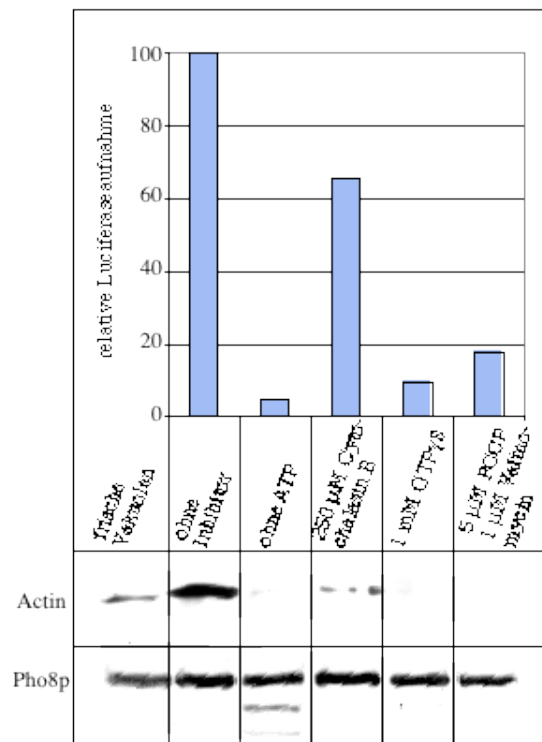
Der Anteil des cytosolischen Actins, das während der ungehemmten Reaktion an die Vakuolen band, betrug etwa 5 %. Dieser Anteil ist viel größer als der Anteil der während einer Aufnahmeaufnahme aufgenommenen Luciferase (etwa 1/4000 der gesamten im Ansatz vorhandenen Luciferase, nicht gezeigt). Dies und die Tatsache, daß eine Aufnahme des cytosolischen Markerproteins Phosphoglyceratkinase im Western Blot nicht nachweisbar war (nicht gezeigt), spricht dafür, daß eine Bindung von Actin an die Vakuole gemessen wurde und nicht die Aufnahme in die Vakuole. Da die Vakuolen während der Reisolierung sowohl pelletiert als auch flotiert wurden, ist auch ausgeschlossen, daß ohne Assoziation an Vakuolen gebildete Actinfilamente mit den Vakuolen fraktionierten und eine Bindung an Vakuolen nur vortäuschten.

(zu Abb. 14.) Proteolyse mit Thrombin freigesetzt („abgespaltenes Protein“). Verunreinigendes Thrombin (68 kDa) wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF inaktiviert; mittels Chromozym TH-Aktivitätsmessung war danach keine proteolytische Aktivität mehr nachweisbar ($< 3 \cdot 10^{-6}$ U/ μ g Protein). Anschließend wurden Glutathion-S-Transferase und ungespaltenes Fusionsprotein mit Glutathion von der Matrix eluiert. Die gereinigten Proteine wurden mittels Ultrafiltration in Centricon 10 konzentriert und in 10 mM PIPES/ 200 mM Sorbitol/ 150 mM KCl überführt. Je 1/20000 jeder Fraktion wurde mittels SDS-PAGE (12.5%) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Von den gereinigten Proteinen wurden je 2 μ g aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind links angegeben.

c) Die wie unter a) und b) beschriebenen gereinigten Proteine wurden in den angegebenen Konzentrationen in 25 μ l-Aufnahmereaktionen (2.2.10., 0.4 mg/ml Vakuolenprotein) eingesetzt. Die Ansätze wurden 5 min auf Eis und dann 60 min auf 27°C inkubiert. Alle Ansätze erhielten gleiche Volumina unterschiedlich konzentrierter Proteinlösungen. Die Vakuolen wurden wie in Material und Methoden beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zur graphischen Darstellung wurden der Eiswert ($< 20\%$ der maximalen Aufnahme) abgezogen und alle Werte auf die ungehemmte Aufnahme (=100) bezogen.

Abb. 15. Bindung von Actin an die Vakuolen während der *in vitro*-Autophagocytose. In

Standardaufnahmereaktionen wurde die Luciferaseaufnahme über 45 min in Abhängigkeit von Hemmstoffen gemessen (oben). Parallel dazu wurde vakuoläres Actin nachgewiesen (unten): Je 350 μ l Reaktionsansatz mit dem entsprechendem Hemmstoff wurde in 2-ml-Reaktionsgefäßen nach 45 min Reaktion zentrifugiert (10000 g; 5 min; Festwinkelrotor; 4° C). Das Pellet wurde in 300 μ l 15% Ficoll, 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol, 105 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP aufgenommen und nacheinander mit folgenden Lösungen überschichtet: 500 μ l 10% Ficoll, 1 ml 8% Ficoll, 200 μ l 0% Ficoll in 10 mM PIPES/KOH pH 6.8, 200 mM Sorbitol, 105 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP. Die Vakuolen wurden durch Zentrifugation flotiert (10000 g; 10 min; Ausschwingrotor; 4° C) und von der 8%/0% Ficoll-Grenzschicht abgenommen. Proteine wurden mit TCA gefällt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Actin und, als Maß für die Menge vakuolären Proteins, Pho8p wurden mittels Immunodekoration nachgewiesen.



Actin bindet *in vitro* an Vakuolen. Sollte es bei der Mikroautophagocytose eine Rolle spielen, so sollte es auch *in vivo* an der Vakuolenmembran lokalisiert sein. Um eine solche Lokalisation durch Immunfluoreszenz nachweisen zu können, mußte zunächst ein geeigneter Vakuolenmarker gefunden werden. Vtc4p, ein vakuoläres Membranprotein, gegen das Antikörper vorlagen (Müller et al., 2002), erwies sich als geeignet. Nachdem der affinitätsgereinigte Antikörper an Zellen von Deletionsmutanten von kreuzreagierenden Immunglobulinen depletiert worden war, färbte er selektiv die Vakuolenmembran, nicht aber Nukleus oder Plasmamembran an. Autophagische Körperchen innerhalb der Vakuolen wurden nicht oder nur schwach angefärbt (Abb. 16).

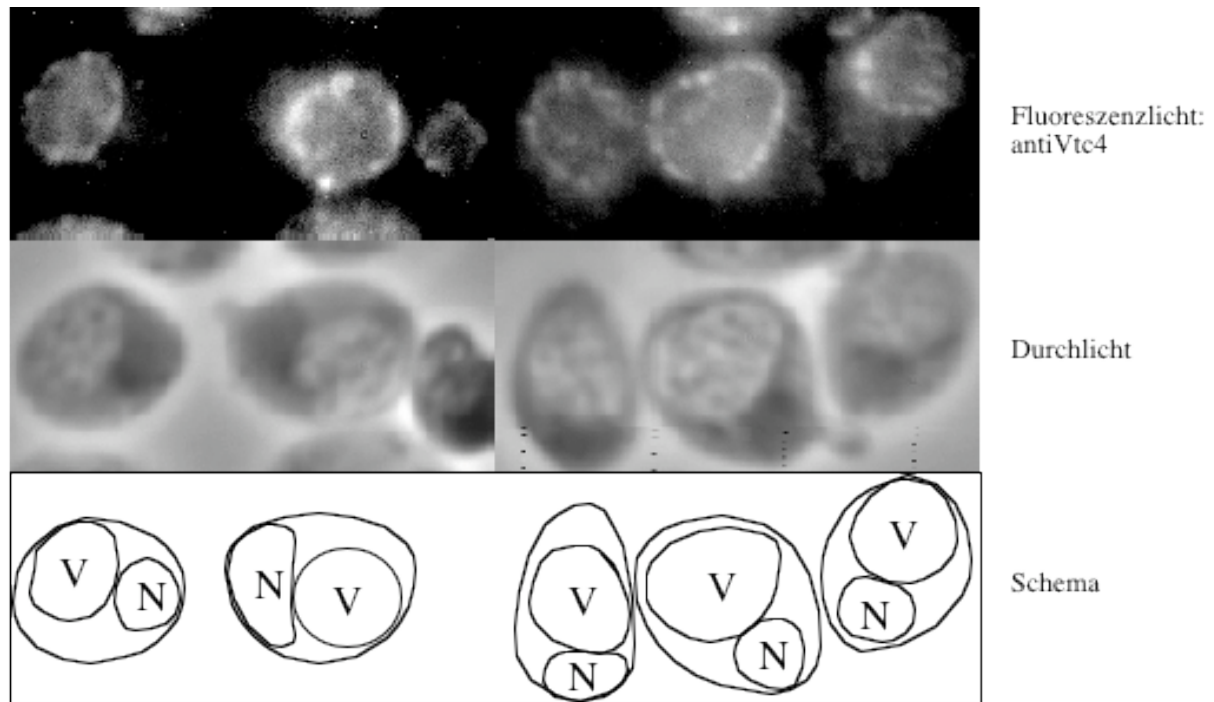


Abb. 16. Färbung von Vakuolen mit antiVtc4p. BJ3505-Zellen wurden für 5h in SD-N gehungert, fixiert und angefärbt wie unter Material und Methoden (2.2.16.) beschrieben. Die vakuoläre Membran wurde mit Ziege-antiVtc4p und Esel-antiZiege-DTAF markiert; Durchlicht- und Fluoreszenzbild derselben Zellen wurden nacheinander aufgenommen. V- Vakuole, N- Nukleus.

Um die Lokalisation von Actin im Beziehung zur Vakuole darzustellen, wurden Doppelfärbungen mit antiVtc4p und antiActin durchgeführt (Abb. 17). Im konfokalen Mikroskop zeigte sich, daß Actin nicht nur in den bekannten kortikalen Actinflecken und den Actinkabeln (d), sondern auch an und in der Vakuole lokalisiert war. Dabei schien es teilweise in das Vakuolenlumen hineinzuragen (a,b) oder auch isoliert in der Vakuole zu liegen (c). Dies entspräche einer möglichen Lokalisation in autophagischen Schläuchen oder autophagischen Körperchen. Da sich Vtc4p nicht in autophagischen Körperchen fand (Abb. 16), war die Membranhüllung von Actinkabeln in Membraneinstülpungen und autophagischen Körperchen nicht darstellbar.

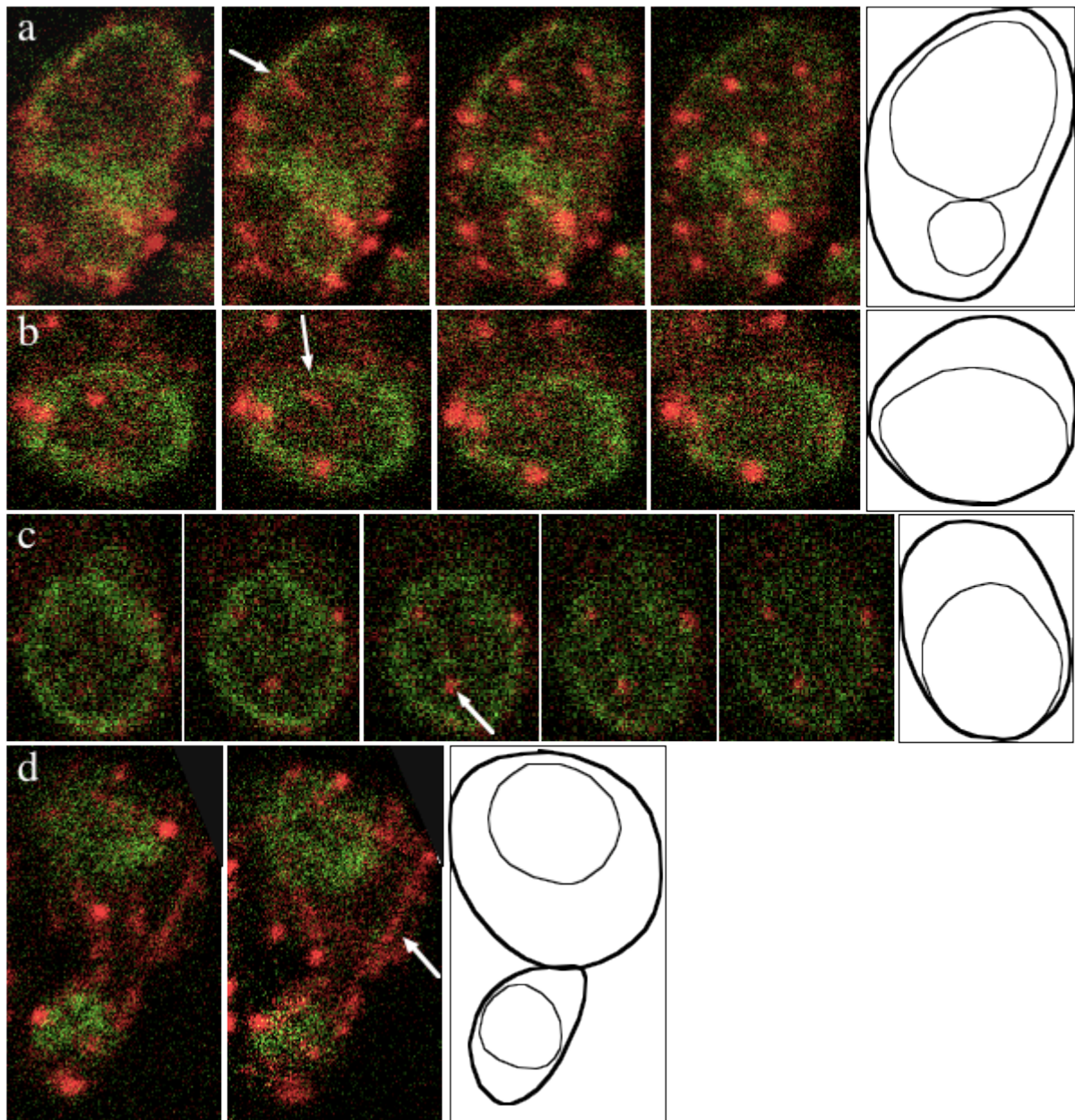


Abb. 17. Lokalisierung von Actin an der Vakuole. BJ3505-Zellen wurden für 5h in SD-N gehungert, fixiert und angefärbt wie unter Material und Methoden (2.2.16.) beschrieben. Die vakuoläre Membran wurde mit Ziege-antiVtc4p und Esel-antiZiege-DTAF (grün) markiert, Actin mit Maus-antiActin und Esel-antiMaus-Cy3 (rot). Mittels konfokaler Mikroskopie wurden mehrere Schichtbilder einzelner Zellen im vertikalen Abstand von 300 nm aufgenommen. Zellumrisse wurden im Schema fett, Vakuolenumrisse dünn skizziert.

Eine genauere Lokalisation von Actin war mittels Immuno-EM möglich. Auch dort waren kortikale Actinflecken (Abb. 18 d) und cytosolisches Actin (Abb. 18 a-f) zu erkennen, daneben aber auch Actin an der Vakuolenmembran und in autophagischen Körperchen (Abb. 18 a-f). Auch dieses Actin trat teilweise, ähnlich den kortikalen Actinflecken, gehäuft auf (Abb. 18 a,c,f). Würde Actin an der Einstülpung und Abschnürung von Membranen ins Vakuolenlumen beteiligt sein, so könnte es sich an den durch Mikroautophagozytose entstandenen autophagischen Körperchen anreichern. Um eine solche Anreicherung zu erkennen, wurden Immunogoldmarkierungen an der Vakuolenmembran und an der Membran von autophagischen Körperchen ausgezählt und auf die Länge der sichtbaren Membran bezogen (Abb. 18 g). Es zeigte sich, daß Actin an der Membran von autophagischen Körperchen gegenüber der Vakuolenmembran um einen Faktor von etwa 2 angereichert war.

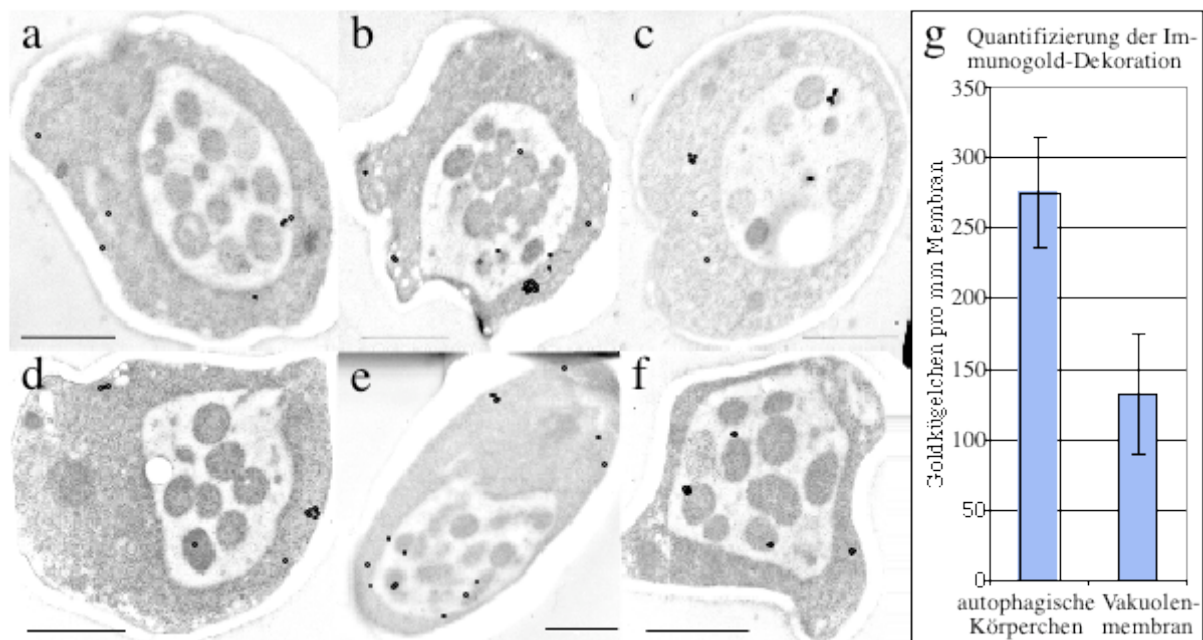


Abb. 18. Immunogold-Markierung von Actin an gehungerten Hefezellen. a-f)

Dünnschnitte von Hefezellen (BJ3505, 3 h in SD-N gehungert, in flüssigem Propan schockgefroren, gefriersubstituiert mit 0.5% Uranylacetat in Ethanol, in Lowicryl HM20 eingebettet; Balken entsprechen $1 \mu\text{m}$) wurden mit Maus-antiActin 1:250/ Ziege-antiMaus-18nm-Goldpartikel dekoriert. Die Position der Goldkörner wurde mit schwarzen Kreisen hervorgehoben; Balken entsprechen $1 \mu\text{m}$.

g) An 34 zufällig ausgewählten Zellen wurde die Zahl der Goldmarkierungen an der Membran der autophagischen Körperchen (insgesamt 96) und an der Vakuolenmembran (insgesamt 33) bestimmt. Um eine Normierung auf den abgebildeten Membrananschnitt vornehmen zu können, wurde dieser ausgemessen. Dargestellt wurde der Quotient aus Zahl der Goldkörner und Länge der angeschnittenen Membran in mm^{-1} für die autophagischen Körperchen und die Vakuolen. Fehlerbalken geben Standardabweichungen zwischen verschiedenen Schnitten desselben Experimentes wieder.

3.4. Suche nach hemmenden Antikörpern

Proteine, die an der Makroautophagocytose beteiligt sind, sind aus genetischen Untersuchungen bekannt. Die Deletion einiger dieser Proteine hat auch Einfluß auf die Bildung von Einstülpungen der Vakuolenmembran *in vivo* (Sattler und Mayer, 2000). Um zu überprüfen, ob diese Aut- und Apg-Proteine möglicherweise auch die *in vitro*-Mikroautophagocytose direkt beeinflussen, wurden Antikörper gegen einige dieser Proteine hergestellt und in die *in vitro*-Autophagocytose eingesetzt. Dazu wurden 5 der zugehörigen Gene in den Expressionsvektor pCRT7/NT-TOPO kloniert. Die resultierenden Vektoren wurde in *E. coli*-Expressionsstämme transformiert, die Aut- und Apg-Proteine als His₆-Tag-Fusionsproteine exprimiert und an Ni-NTA-Agarose gereinigt (Abb. 19). Aut1p und Apg16p wurden nativ gereinigt, Apg5p, Apg6p und Apg10p denaturierend aus Einschlußkörperchen.

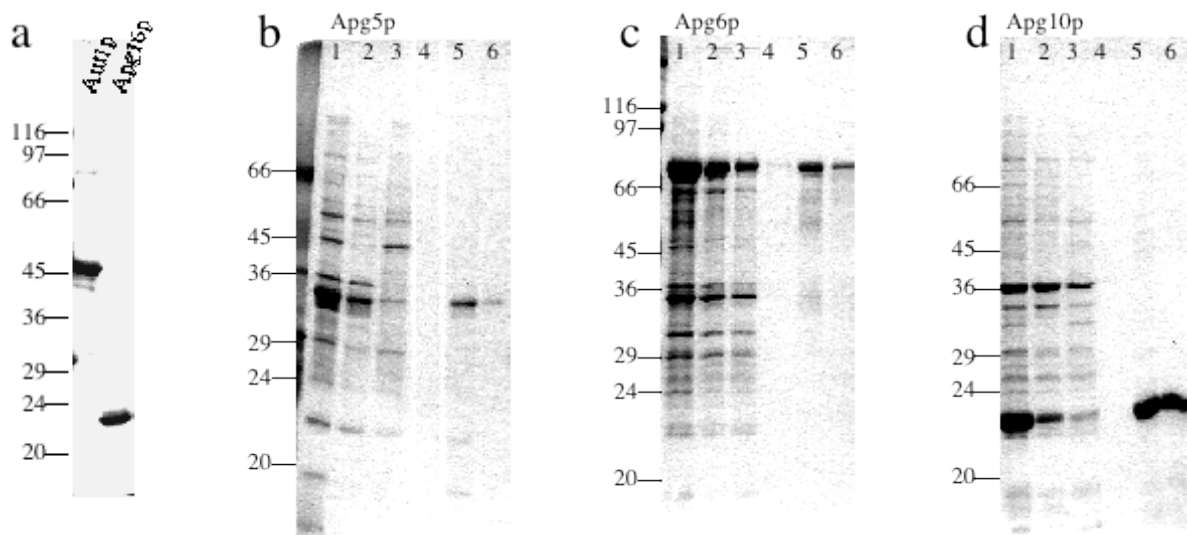


Abb. 19. Reinigung von Aut- und Apg-Proteinen. a) Aut1p und Apg16p wurden aus dem löslichen Überstand von überexprimierenden, aufgeschlossenen *E. coli* an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe 2.2.23., 2.2.24.). Je 5 μ g der gereinigten Proteine wurden auf einem 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

b-d) Apg5p, Apg6p und Apg10p wurden aus Einschlußkörperchen an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe 2.2.23., 2.2.25.). Je 1/500 des Auftrages (1) und des Durchlaufes (2), je 1/150 der Waschschriffe mit Harnstoff, pH 6.3 (3) und Citrat, pH 7.0 (4), und je 1/300 des ersten (5) und zweiten (6) Milliliters des Eluats wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind links angegeben.

Die gereinigten Proteine wurden zur Immunisierung von Kaninchen verwendet; aus dem Serum der Tiere wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie an immobilisierten Antigenen gewonnen. Drei der gewonnenen Antikörper, antiAut1p, antiApg5p und antiApg6p, konnten im Western Blot überprüft werden, da Deletionsmutanten der entsprechenden Gene vorlagen (Abb. 20).

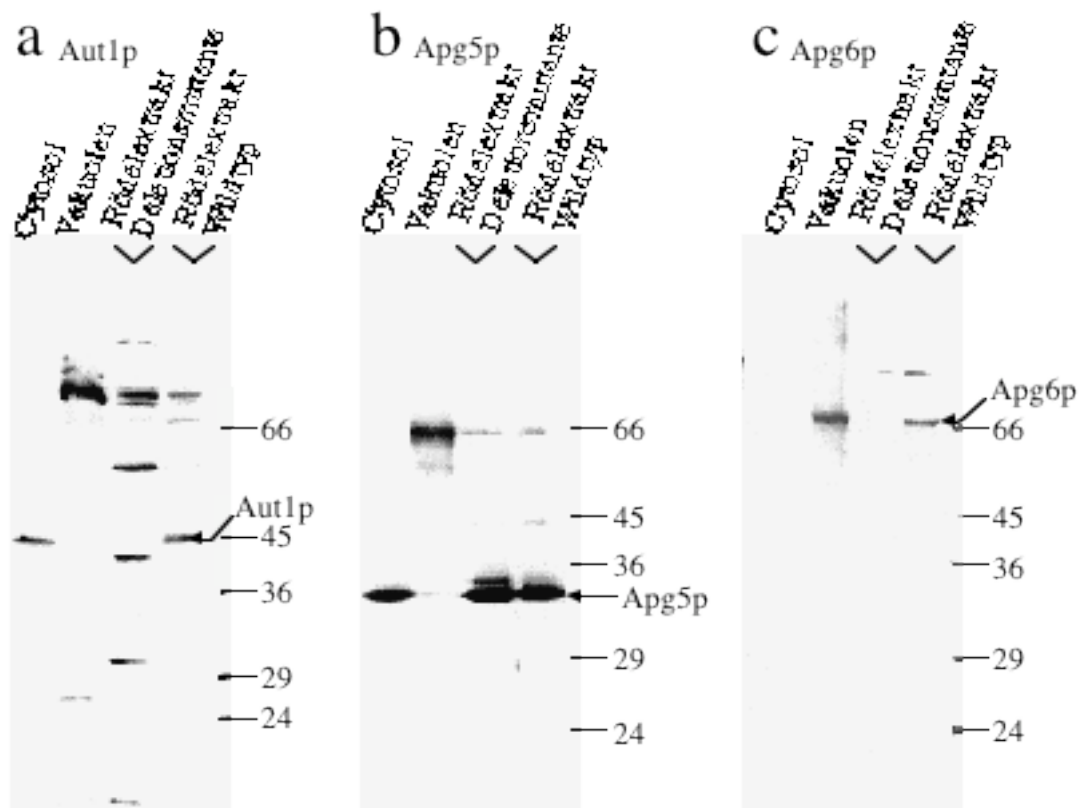


Abb. 20. Nachweis von Aut- und Apg-Proteinen im Western Blot. Wildtypcytosol, Wildtypvakuolen (je 50 μg Protein) und Ganzzellrödellextrakte (siehe 2.2.14.) von Wildtyp sowie Deletionsmutanten (je entsprechend 0.3 OD Einheiten) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Aut- und Apg-Proteine wurden mittels Immunodekoration mit affinitätsgereinigten Antikörpern (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nachgewiesen. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind rechts angegeben.

Aut1p (vorhergesagtes Molekulargewicht 36) erschien als Bande bei 45 kDa, die nur im Ganzzellextrakt von Wildtypzellen, nicht jedoch von der Deletionsmutante auftrat. Im Cytosol war diese Bande die einzige immunoreaktive Bande, sie fehlte auf isolierten Vakuolen. Aut1p scheint also ein lösliches, nicht an die Vakuolenmembran gebundenes Protein zu sein.

Bei Dekoration von Blots mit antiApg5p (vorhergesagtes Molekulargewicht 34) trat sowohl im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante eine Bande in der erwarteten Höhe auf. Auch diese Bande trat im Cytosol, nicht aber an Vakuolen auf. Ob diese Bande tatsächlich Apg5p entspricht und somit der verwendete Deletionsstamm nicht den angegebenen Genotyp hat oder ob der Antikörper mit anderen Proteinen kreuzreagiert, kann ohne weitere Untersuchungen nicht sicher entschieden werden.

Dekoration von Blots mit antiApg6p (vorhergesagtes Molekulargewicht 63) ergab eine einzige Bande bei 67 kDa, die ausschließlich im Wildtyp, nicht aber in der Deletionsmutante auftrat. Apg6p war allein auf die Vakuolen beschränkt, im Cytosol war es nicht nachweisbar. Es scheint also ein membrangebundenes Protein zu sein.

antiApg10p und antiApg16p konnten nicht im Western Blot mit Hefezellextrakt überprüft werden, da die entsprechenden Deletionsstämme nicht vorlagen. Auf Blots mit in *E. coli* exprimiertem Protein erkannten sie das Protein, das in die Kaninchen injiziert wurde; auf Blots mit Ganzellextrakt von Wildtyphefen wurden mehrere Banden erkannt, wobei aufgrund der Unsicherheit bezüglich der Vorhersage von Molekulargewichten die Banden den gesuchten Proteinen nicht sicher zugeordnet werden konnten (nicht gezeigt).

Die Reinigung der Antikörper ergab unterschiedliche Mengen an Immunglobulin. antiAut1p und antiApg16p konnten daher in höherer Konzentration in die *in vitro*-Autophagocytose eingesetzt werden als antiApg5p, antiApg6p und antiApg10p. Keiner der eingesetzten Antikörper zeigte, verglichen mit an Protein A aufgereinigtem Kontrollimmunglobulin aus Präimmenserum, in den verwendeten Konzentrationen eine deutliche Hemmung der *in vitro*-Autophagocytose (Abb. 21).

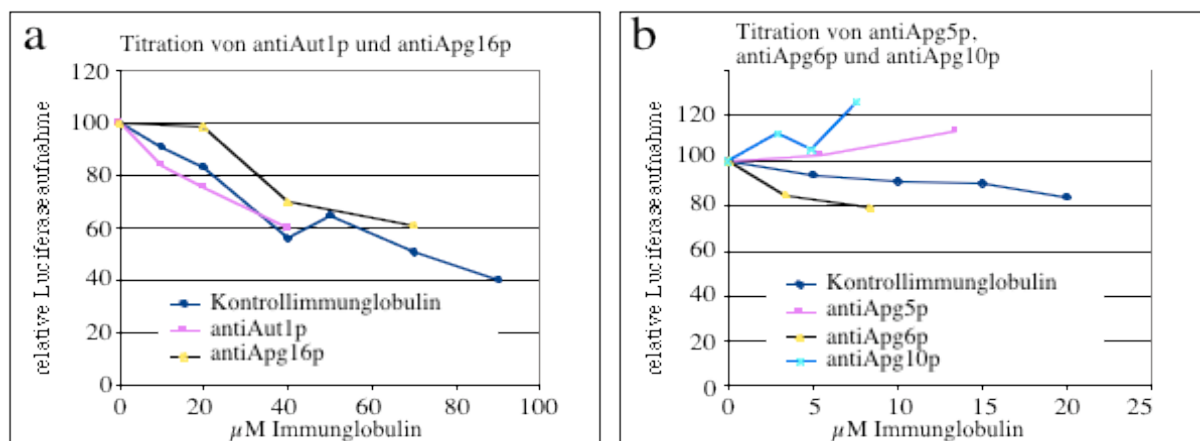


Abb. 21. Titration von Antikörpern in der *in vitro*-Autophagocytose. Die angegebenen Konzentrationen an affinitätsgereinigten Antikörpern wurden zu 25 µl- Aufnahmereaktionen gegeben (0.4 mg/ml Vakuolen). Nach 1 h Inkubation bei 27° C wurden die Vakuolen wie in Material und Methoden (2.2.10.) beschrieben gewaschen, mit Proteinase K verdaut und die aufgenommene Luciferase im Verhältnis zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurde der Eiswert (< 7 % der maximalen Aufnahme) abgezogen; zur graphischen Darstellung wurden alle Werte auf die ungehemmte Aufnahme (=100) bezogen. Als Kontrolle wurden an Protein A-Sepharose aufgereinigtes Immunglobulin aus Präimmenserum eingesetzt. Bei der Reinigung von antiAut1p und antiApg16p (a) waren höhere Ausbeuten erzielt worden, so daß größere Mengen in die Titration eingesetzt werden konnten als von antiApg5p, antiApg6p und antiApg10p (b).

4. Diskussion

4.1. Aufteilung der *in vitro*-Mikroautophagocytose in vier Stadien

Frühere Studien (Müller et al., 2000; Sattler und Mayer, 2000) lieferten eine morphologische Beschreibung und die *in vitro*-Rekonstitution der Mikroautophagocytose an Hefevakuolen als Modellsystem für die Entstehung von Vesikeln durch „inverses Budding“. In dieser Arbeit konnten einige niedermolekulare Hemmstoffe der *in vitro*-Mikroautophagocytose charakterisiert werden. Mit ihrer Hilfe konnte diese Reaktion in mehrere Stufen aufgeteilt werden (Tab. 4)

Tab. 4. Stadien der *in vitro*-Autophagocytose. Die Ergebnisse kinetischer Experimente (Abb. 5, 8, 10, 11) wurden in ein Stadienmodell der *in vitro*-Autophagocytose zusammengefaßt. Den einzelnen Stadien wurden die bekannten Wirkungen der Hemmstoffe und plausible molekulare Ereignisse zugeordnet.

	Inhibitor	potentielles Ziel	potentielles Korrelat
Stadium I	GTP[γ S], Aristolochiasäure, Nystatin	G-Proteine (Cdc42p ?), Phospholipase, Ergosterol	Lipidmodellierung, laterale Sortierung von Membranproteinen und Lipiden
Stadium II	Transfer auf Eis	Membranfluidität	Membraneinstülpung
Stadium III	FCCP/Valinomycin	Membranpotential	Organisation des Actinskeletts
Stadium IV	K252a, Rapamycin	Kinase (Tor2p ?)	Abschnüren vorgebildeter Vesikel

In einer ersten Stufe erwirbt die Reaktion eine Resistenz gegenüber GTP[γ S], dem Phospholipaseinhibitor Aristolochiasäure und dem sterolbindenden Antimykotikum Nystatin (I, Abb. 5 b,d,f). Auf dieser und der folgenden Stufe (II) kann die Aufnahme des umgebenden Mediums jedoch noch durch Transfer auf Eis gestoppt werden. Auf einer späteren Stufe (III) ist dies nicht mehr möglich, obwohl der Protonengradientenkoppler FCCP sowie die Proteinkinaseinhibitoren K252a und Rapamycin nach wie vor die Aufnahme blockieren können (Abb. 5 a,c,e). Die Unfähigkeit tiefer Temperaturen, die Aufnahme gegen Ende der Reaktion zu unterbinden, erklärt auch den steilen Verlauf der Eiskurve zwischen 30 und 45 min (Abb. 5): Wird ein Reaktionsansatz nach 45 min auf Eis gestellt, so geht die Luciferaseaufnahme dennoch weiter, der 45 min-Wert einer Kinetik erscheint falsch hoch. Alle bisher genannten Hemmstoffe wirken weniger auf die eigentliche Aufnahme (IV) als auf vorgeschaltete Prozesse (Abb. 10): Sie verhindern, daß die Vakuolen einen „kompetenten“ Zustand erwerben, der ihnen ermöglicht, schnell und weitgehend unabhängig vom umgebenden Medium (Abb. 11) Proteine aufzunehmen. Ist dieser „kompetente“ Zustand

erreicht, so haben nur noch die Proteinkinaseinhibitoren K252a und Rapamycin einen gewissen hemmenden Einfluß auf die Luciferaseaufnahme (Abb. 10 b). Allerdings kann der Zustand der Aufnahmekompetenz durch plötzliche Wechsel der Ionenstärke des Puffers zerstört werden (Abb. 11). Auch die den anderen Reaktionsstufen entsprechenden Zustände der Vakuolen sind nicht stabil, sondern werden durch Reisolieren der Vakuolen gestört. Deshalb ließ sich der Reaktionsablauf nicht vollständig in diskrete Einzelreaktionen auflösen (Abb. 7), obwohl sich die Wirkung der einzelnen Hemmstoffe durch Auswaschen aufheben läßt (Abb. 6). Bei diesen pharmakologisch definierten Stadien der Gesamtreaktion bleibt jedoch zu beachten, daß die Wirkung der einzelnen Hemmstoffe nicht sofort nach Zugabe zur Reaktion einsetzen muß. Dies wäre beispielsweise bei einer verzögerten Bindung an das Zielprotein der Fall. Dadurch könnte die Giftwirkung fälschlicherweise erst auf einer späteren Reaktionsstufe manifest werden.

Da die Zielstrukturen der eingesetzten Hemmstoffe weitgehend bekannt sind, können den zunächst nur kinetisch definierten Reaktionsstadien zumindest spekulativ molekulare Ereignisse zugeordnet werden. GTP[γ S] hält G-Proteine in ihrem GTP-bindenden, aktiven Zustand fest und verhindert so ihren Wechsel zwischen GDP- und GTP-gebundenem Zustand. Ypt7p, eine vakuoläre Rab-GTPase, die für das Andocken der Membranen für die homotypische Vakuolenfusion nötig ist, ist an der Mikroautophagocytose nicht beteiligt (Sattler und Mayer, 2000). Ein anderer Kandidat als Ziel für GTP[γ S] ist Cdc42p, eine Rho-GTPase. Es wurde identifiziert als ein am Ausknospen von Tochterzellen und dem Aufbau der Zellpolarität beteiligtes Protein (Adams et al., 1990). Später wurden dem auch in Säugern konservierten Protein eine Beteiligung am Auf- und Umbau des Actincytoskeletts, aber auch am Vesikeltransport und weiteren zellulären Vorgängen zugeschrieben (Johnson, 1999). Auch an der Vakuolenvererbung ist Cdc42p beteiligt (Eitzen et al., 2001; Müller et al., 2001). Möglicherweise verhindert GTP[γ S] über eine Inaktivierung von Cdc42p die Polymerisierung von Actin an der Vakuolenmembran (Abb. 15) und somit die Voraussetzung zur Bildung der Membraneinstülpungen. Auch FCCP/Valinomycin verhindert die Bindung von Actin an die Vakuole (Abb. 15), wirkt jedoch zu einem späteren Zeitpunkt als GTP[γ S]. Ob diese Reihenfolge auch einer zeitlichen Abfolge des Aufbaus eines Actinskeletts entspricht- zunächst würde dafür Cdc42p, später ein intaktes Membranpotential benötigt- kann aus den vorliegenden Experimenten nicht entschieden werden. Alternativ könnte die frühe Wirkung von GTP[γ S] auch völlig unabhängig vom Actincytoskelett sein und andere GTPasen als

Cdc42p betreffen. Die zusätzliche Störung der Actinpolymerisierung ließe sich dann als späte Wirkung kinetisch nicht mehr nachweisen.

Auch der Phospholipaseinhibitor Aristolochiasäure und das sterolbindende Pilzgift Nystatin wirken in Stufe I. Sie verhindern möglicherweise ein Ummodellieren und Umsortieren der Membranlipide. Ein solches Ummodellieren durch Übertragung von Arachidonsäure auf Lysophosphatidsäure findet beispielsweise bei der Endocytose statt, wodurch die notwendige negative Membrankurvatur für das Einstülpen von Vesikeln geschaffen wird (Schmidt et al., 1999). Auch bei der Einstülpung von Schläuchen in die Vakuole entstehen Bereiche stark unterschiedlicher Membrankurvatur: Besonders das cytoplasmatische Blatt der Membran des Halses des sich abschnürenden Vesikels und des Fußes des zugehörigen Schlauches (siehe Abb. 1 a) sind stark positiv gebogen und sollten daher an invertiert-konischen Lipiden wie den Lysolipiden angereichert sein. Diese könnten durch eine cytoplasmatische Phospholipase entstehen, die ein Ziel für die Wirkung von Aristolochiasäure böte. Sind diese Lysolipide erst einmal entstanden, kann eine Hemmung der entsprechenden Phospholipase keine Wirkung mehr auf den weiteren Fortgang der Bildung von Membranschläuchen haben- entsprechend der Wirkung von Aristolochiasäure in Phase I.

Ähnliches gilt für Nystatin. Es bindet Sterole und kann so Poren in Membranen bilden, die zu einem Zusammenbruch des Protonen- und Ionengradienten führen (Bhuiyan et al., 1999). Eine Wirkung auf das elektrochemische Potential der Vakuolenmembran ist im vorliegenden System unwahrscheinlich, da Nystatin dann ebenso wie FCCP/Valinomycin auf einer späteren Reaktionsstufe wirken sollte. Wahrscheinlicher erscheint eine Wirkung auf die Membranfluidität durch das Abfangen von Ergosterol. Die Umverteilung der Sterole in der Membran könnte die Einstülpung von Schläuchen verhindern oder sterolreiche Membranbezirke, die beispielsweise für die Anheftung cytoplasmatischer Proteine nötig sein könnten, zerstören. Beides würde in eine frühe Phase der Reaktion fallen, da sich in späteren Stadien schon nystatinresistente Membranbezirke gebildet haben könnten, die durch entsprechende Proteine stabilisiert würden. Mit dieser Reorganisation der Vakuolenmembran einhergehen könnte auch die im Elektronenmikroskop auffallende heterogene Verteilung von großen Membranproteinen: Die Membran der eingestülpten Schläuche erscheint nach der Spitze hin zunehmend glatt und proteinarm, während in der Vakuolenmembran zahlreiche Membranproteine erkennbar sind (Müller et al., 2000). Der heterogenen Proteinverteilung könnte eine heterogene Lipid- und Sterolverteilung zugrunde liegen, wie sie ähnlich für die

verschiedenen Cisternen des Golgi-Apparates beschrieben wurde (Simons und Ikonen, 2000; Holthuis et al., 2001). Auch die endocytotische Aufnahme von Membranproteinen kann durch Anreicherung der aufzunehmenden Proteine in cholesterolreichen Caveolae vermittelt werden und wird dann durch sterolbindende Pharmaka wie Nystatin gehemmt (Lobie et al., 1999). Nicht nur die Mikroautophagocytose, sondern auch die homotypische Fusion von Hefevakuolen wird durch Nystatin gehemmt. Die dafür benötigte Nystatinkonzentration liegt allerdings um etwa ein Zehnfaches höher als die für die Hemmung der Mikroautophagocytose (Kato und Wickner, 2001). Durch diese Konzentration wurde die ATP-getriebene Ansäuerung des Vakuolenlumens nicht verhindert, sondern selektiv das mit einer Freisetzung von Sec17p verbundene „Priming“, also die Aktivierung der SNARE-Komplexe, gestört. Neben Sterolen werden auch andere Lipide wie Phosphatidylinositolphosphate für das „Priming“ benötigt (Mayer et al., 2000), was auf eine Beteiligung von Membranlipiden an dem bisher nur auf Proteinebene charakterisierten „Priming“ hinweist. Neomycin, ein an Phosphatidylinositolphosphate bindendes Antibiotikum, hemmt auch die Mikroautophagocytose (Tab. 2), allerdings kann eine Lyse der Vakuolen unter den Versuchsbedingungen nicht ausgeschlossen werden: Durch Neomycin werden die Vakuolen stark verklumpt und können beim Waschen nur schwer resuspendiert werden. Dies führt dazu, daß ein Teil der Hemmung durch Neomycin auch dann beobachtet werden kann, wenn Neomycin erst nach Abschluß einer Aufnahme-reaktion zugegeben wird. Dennoch könnte die Wirkung von Polyenantimykotika und Neomycin, ähnlich wie beim „Priming“ der homotypischen Vakuolenfusion, auf eine Rolle für Lipide wie Sterole und Phosphatidylinositolphosphate bei frühen Schritten der Mikroautophagocytose hindeuten.

Überraschend erscheint die relativ frühe Wirkung tiefer Temperaturen auf die Reaktion, die auf Stufe II hemmt, ohne daß die nachgeschalteten Stufen beeinflußt werden. Dies widerspricht der Vorstellung, daß Prozesse, die eine Membranfusion beinhalten- wie beispielsweise die Endocytose-, unterhalb einer Übergangstemperatur von etwa 14°C nicht mehr stattfinden können (Wilschut et al., 1985; Pelham, 1989; Grant et al., 2001). Das Abschnüren von Vesikeln an der Spitze eines Schlauches erfordert die homotypische Fusion gegenüberliegender Membranen. Dazu wird jedoch nicht die konservierte Fusionsmaschinerie eingesetzt, die für den letzten Schritt der Vakuolenvererbung nötig ist (Sattler und Mayer, 2000). Möglicherweise erfolgt also die Membranfusion bei der Mikroautophagocytose nicht auf klassischem Wege, sondern durch bloßes mechanisches Abschnüren der Vesikel. Dieses könnte sogar durch den Phasenübergang der Membran bei tiefen Temperaturen gefördert

werden: Stark gespannte Membransysteme wie der Hals eines sich abschnürenden Vesikels werden durch die dichtere Packung bei tiefen Temperaturen destabilisiert. Als Modell hierfür kann die Labilität und Fusogenität kleiner Liposomen unterhalb einer Übergangstemperatur dienen (Suurkuusk et al., 1976; Lentz et al., 1987). Darüber hinaus wäre vorstellbar, daß in dem betrachteten *in vitro*-System der physiologische Weg der Membranfusion durch einen artefiziellen ersetzt oder ergänzt wird. Beispielsweise könnten vorgeformte Vesikel durch kurzes Vortexen von der Spitze der autophagischen Schläuche abgeschert werden. Dies würde durch die verringerte Membranfluidität bei niederen Temperaturen womöglich noch begünstigt werden.

Stufe III der Reaktion wird durch die Entkoppelung des Membranpotentials mittels FCCP und Valinomycin blockiert. Das Membranpotential ist für eine ganze Reihe von Vorgängen an der Vakuolenmembran essentiell. So kann sich beispielsweise Actin nur an energetisierte Vakuolen anlagern (Abb. 15). Alternativen als Ursache für die Abhängigkeit der Mikroautophagocytose vom Membranpotential sind die Verhinderung der Anlagerung anderer essentieller cytoplasmatischer Faktoren an die Vakuolenmembran oder auch der Verlust der durch den partiellen Ladungsausgleich- bei Aufnahme eines positiv geladenen Vesikels in das negativ geladen Vakuoleninnere- bedingten Triebkraft der Reaktion. Sicher ist jedoch das Membranpotential nicht die einzige Ursache für den ATP-Bedarf der Gesamtreaktion: Auch die *in vitro* Vakuolenfusion bedarf des Membranpotentials und läßt sich durch FCCP hemmen. Die optimale ATP-Konzentration für die Vakuolenfusion ist jedoch um den Faktor 4 geringer als die für die Mikroautophagocytose (Haas, 1995). Es ist also zu erwarten, daß bestimmend für die optimale ATP-Konzentration der *in vitro*-Autophagocytose nicht die protonenpumpende V-ATPase, sondern andere ATP-verbrauchende Enzyme sind.

Stufe IV ist die einzige Reaktionsstufe, die sich von den vorhergehenden Stadien durch Reisolieren der Vakuolen experimentell trennen läßt. Sie ist abhängig davon, daß die Vakuolen die vorhergehenden Stadien durchlaufen haben. Wird das durch Zugabe von Hemmstoffen oder durch Mangel an ATP verhindert, kann die eigentliche Aufnahme nicht ablaufen, die selbst nur noch durch K252a und Rapamycin zu etwa 50% gehemmt wird (Abb. 10) und auch weitgehend unabhängig vom Medium ist (Abb. 11). Die eigentliche Aufnahme könnte damit dem Abschnüren von Vesikeln an der Spitze der autophagischen Schläuche entsprechen, die während der vorhergehenden Stufen gebildet wurden. Dieses Abschnüren

benötigt möglicherweise die Aktivität einer Proteinkinase, die durch K252a und Rapamycin gehemmt wird. Die Beteiligung dieser Kinase am letzten Reaktionsschritt würde auch die verhältnismäßig hohen Konzentrationen dieser Giftstoffe erklären, die für eine vollständige Hemmung der Aufnahme nötig sind: Geringe verbleibende Restaktivitäten dieser Kinase könnten genügen, um das schnell ablaufende Abschnüren von Vesikeln zu unterstützen. Würden K252a und Rapamycin auf früheren Reaktionsstufen wirken, so würden schon geringere Hemmstoffkonzentrationen genügen, den Ablauf über den Meßzeitraum hinaus zu verzögern. Potentielle Ziele der Wirkung von Rapamycin und K252a sind die TOR-Kinasen, die eine Reihe von durch Rapamycin hervorgerufenen Effekte bewirken (Raught et al., 2001). Die Rolle von Tor2p, einer rapamycinsensitiven Proteinkinase, in der Induktion der Makroautophagocytose unter Hungerbedingungen ist gut untersucht (Klionsky und Emr, 2000). Sie wird *in vitro* durch Rapamycin in Konzentrationen von 0.5 μM weitgehend gehemmt (Alarcon et al., 1999). Um diese Hemmung zu erreichen, mußte jedoch der vorgebildete Komplex aus dem in allen Eukaryonten konservierten Rapamycin-Bindeprotein FKBP und Rapamycin eingesetzt werden. Dies könnte, zusätzlich zu den oben genannten kinetischen Erwägungen, erklären, warum die Rapamycinkonzentration, die für die Hemmung der *in vitro*- Mikroautophagocytose nötig war, um den Faktor 100 höher lag: Das eingesetzte Rapamycin muß zunächst das im Versuchsansatz relativ verdünnte cytosolische FKBP binden, bevor der Komplex aus beiden auf die Zielkinase wirken kann.

Auffällig ist der gegensätzliche Effekt von Rapamycin auf Makro- und Mikroautophagocytose: Während erstere *in vivo* durch Rapamycin induziert wird, wird letztere *in vitro* durch Rapamycin gehemmt. Dies steht in scheinbarem Widerspruch zu der Beobachtung, daß die Mikroautophagocytose durch Cytosol gehungerter Zellen stärker als durch Cytosol ungehungerter Zellen stimuliert wird (Sattler und Mayer 2000), daß also Mikro- und Makroautophagocytose durch denselben Stimulus ausgelöst werden. Dieser Widerspruch löst sich, wenn man die verschiedenen Zeitpunkte der Wirkung von Rapamycin *in vivo* und *in vitro* beachtet: Die durch Tor2p vermittelte Induktion von Makroautophagocytose *in vivo* durch Rapamycin erfolgt, wie auch die Induktion unter Hungerbedingungen, über mehrere Stunden und erfordert *de novo* Proteinsynthese (Kamada et al., 2000; Abeliovich und Klionsky, 2001). Dagegen wird *in vitro* nur die eigentliche Aufnahmereaktion, nicht aber ihre Induktion gemessen. Es erscheint also möglich, daß Rapamycin zwar die Induktion der Autophagocytose über eine Hemmung von Tor2p bewirkt, aber in einem sehr viel späteren Schritt die Mikroautophagocytose hemmt. Dabei bleibt offen,

ob die Hemmung der eigentlichen mikroautophagischen Aufnahmereaktion ebenfalls durch Tor2p vermittelt wird oder ob Rapamycin zusätzlich durch andere, möglicherweise auch unspezifische Mechanismen wirkt.

Bemerkenswert ist die Labilität des für Stadium IV charakteristischen „kompetenten Zustandes“: Die schnelle Aufnahme nach entsprechender Vorbereitung der Vakuolen kann sowohl in komplettem Reaktionsmedium als auch in ATP- und cytosolarem Puffer stattfinden. Dennoch wird sie völlig unterdrückt, wenn die Vakuolen nach der Vorinkubation zunächst in Puffer aufgenommen werden und dann erst Salze, ATP und Cytosol des Reaktionsmediums zugegeben werden (Abb. 11). Sie ist also nicht nur von der chemischen Zusammensetzung des die Vakuolen umgebenden Mediums abhängig, sondern auch von der Geschichte des Reaktionsansatzes: Während des Wechsels des Puffers geht die Aufnahmekompetenz verloren. Eine Erklärung für diese Labilität wäre ein Zustand, in dem schon vorgebildete Vesikel an der Spitze von autophagischen Schläuchen sitzen, wobei das Lumen dieser Vesikel noch in Kontinuität mit dem die Vakuolen umgebenden Medium stünde. Dieser Zustand wurde elektronenmikroskopisch beschrieben (Müller et al., 2000). Unter geeigneten Bedingungen- möglicherweise begünstigt durch den mechanischen Stress der Reisolierung der Vakuolen- schnüren sich diese Vesikel in das Vakuolenlumen ab und bewirken so die „schnelle“ Aufnahme. Jedoch kann dieser Zustand auch so gestört werden, daß die vorgebildeten Vesikel ihre Kompetenz, sich abzuschnüren, verlieren. Dies geschieht beispielsweise durch die rasche Änderung der Pufferzusammensetzung. Über den Mechanismus dieser Störung des kompetenten Zustandes kann nur spekuliert werden. Beispielsweise könnten Membranproteine, die für das Aufrechterhalten des Vesikelhalses nötig sind, abgelöst werden oder es könnte durch die Osmolaritätsänderung der Turgor der Vakuole so gestört werden, daß die schon gebildeten autophagischen Schläuche wieder ausgestülpt würden. Aus anderen Modellsystemen sind ähnliche kompetente Zustände bekannt (Jahn und Südhoff, 1999; Capogna et al., 1997). So werden synaptische Vesikel an die präsynaptische Membran transportiert und dort angedockt. Die eigentliche Exocytose als Antwort auf einen durch ein Aktionspotential ausgelösten Ca^{2+} -Anstieg oder auch, *in vitro*, durch Zugabe von hyperosmolarer Saccharoselösung oder Phorbolestern, erfolgt dann in Bruchteilen einer Millisekunde. Dabei müssen die Vesikel nicht notwendigerweise vollständig mit der Zellmembran verschmelzen, sondern können auch im Sinne einer „kiss and run“-Fusion direkt nach Freisetzung ihres Inhaltes wiedergewonnen werden (Valtorta et al., 2001; Schneider, 2001). Der Zustand während der Freisetzung des Vesikellumens entspricht dem

kompetenten Zustand der Mikroautophagocytose: Er kann aufgelöst werden durch Abschnürung und Rückbildung des intakten Vesikels oder durch vollständiges Verschmelzen des Vesikels mit der Zellmembran, entsprechend der schnellen Aufnahme oder dem Verlust der Aufnahmekompetenz.

4.2. Die Rolle von Actin in der Mikroautophagocytose

Für die Mikroautophagocytose typisch ist das Abweichen der Vakuolenmembran von der Idealform einer Kugel. Dies kann, alternativ zu Änderungen der Membrankurvatur durch horizontale Heterogenität der Lipidzusammensetzung, durch Einwirkung von mechanischen Kräften geschehen. Für die Übertragung solcher Kräfte geeignet erscheint das Actincytoskelett. Substanzen, die den Aufbau von Actinfilamenten beeinflussen, zeigten eine hemmende Wirkung auf die Mikroautophagocytose *in vitro* (Abb. 13 und 14). Dazu werden Konzentrationen benötigt, die im Bereich derer liegen, die auch das Wachstum von Hefen *in vivo* hemmen (Ayscough et al., 1997). Sicher werden diese Konzentrationen nicht nur durch die Actinkonzentration im Reaktionsansatz bestimmt, sondern auch durch das Vorhandensein actinbindender Proteine, die die Actinpolymerisierung beeinflussen können. Die für Twinfilin gefundene hohe Konzentration, die die Mikroautophagocytose hemmt, mag zusätzlich auf einer partiellen Denaturierung des gereinigten Proteins beruhen. Rekombinant hergestelltes Twinfilin präzipitiert durch Einfrieren und Auftauen (Goode et al., 1998), möglicherweise liegt auch schon das frisch gereinigte Protein zum Teil in denaturierter Form vor.

Dementsprechend wäre die in Abb. 14 bestimmte Hemmkonzentration fälschlicherweise zu hoch. Einige weitere Befunde weisen auf eine Rolle von Actin in der Mikroautophagocytose hin: Während der *in vitro*-Reaktion bindet Actin an Vakuolen, was durch einige Hemmstoffe der Mikroautophagocytose verhindert wird (Abb. 15). Auch *in vivo* läßt sich eine Assoziation von Actin mit der Vakuole gehungerter Zellen nachweisen (Abb. 17). Das Actin der Vakuolenmembran ist ähnlich dem der Plasmamembran in „Patches“ konzentriert, einzelne Actinkabel scheinen jedoch auch in die Vakuole hineinzuragen. Dies mag den ähnlichen Funktionen entsprechen, die vakuoläres und corticales Actin wahrzunehmen haben: Das Actin der Plasmamembran dient unter anderem dem Ausknospen von Tochterzellen und der Bildung von „Shmoo“-Ausstülpungen in haploiden Zellen (Doyle und Botstein, 1995)- beides Prozesse, die analog der Mikroautophagocytose eine starke Verformung von Membranen erfordern. Elektronenmikroskopisch ließ sich die Lokalisation des vakuolären Actins weiter auflösen. Dabei zeigte sich, daß autophagische Körperchen Actin gegenüber der

Vakuolenmembran um den Faktor zwei anreichern (Abb. 18). Eine weitere Differenzierung zwischen durch Makro- und Mikroautophagocytose entstandenen autophagischen Körperchen war leider nicht möglich. Eine solche Differenzierung könnte Aufschluß darüber geben, ob Actin an beiden Autophagocytoseformen beteiligt ist oder ob es sich auf die Mikroautophagocytose limitiert. Die genannten Ergebnisse lassen eine Beteiligung von Actin an der Mikroautophagocytose als sehr wahrscheinlich erscheinen.

Dies wäre ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von Actin bei der Verformung von Membranen, wie sie in verschiedenen anderen Zelltypen beschrieben ist. So enthalten Mikrovilli und Stereocilien, also Ausstülpungen der Plasmamembran nach außen, Actin als formgebendes Gerüst (Krstic, 1984). Noch weiter geht die Analogie mit der Mikroautophagocytose bei der apokrinen Sekretion von Schweißdrüsen, wobei apikale Teile der Drüsenzellen abgeschnürt werden. Hier sind Actinfilamente an der Stelle der Abschnürung nachweisbar (Metzler et al., 1992). Auch das Ausstoßen der Nuklei erythroider Vorläuferzellen geschieht mit Hilfe eines kontraktiven Rings aus Actin, Myosin und Spektrin (Takano-Ohmuro et al., 1996). Im Lumen von Exosomen, also von Vesikeln, die durch Einstülpung der Membran endosomaler Kompartimente entstanden sind, fanden sich ebenfalls Actin und einige seiner wechselwirkenden Proteine angereichert gegenüber dem Cytoplasma (Théry et al., 2001).

Die Mikroautophagocytose ist nicht die einzige vakuoläre Funktion, bei der eine Beteiligung von Actin gefunden wurde. Auch die Vakuolenvererbung ist von Actin abhängig (Hill et al., 1996). Dabei scheint Actin mit Hilfe von Myo2p, einem Myosin V, und dem vakuolären Membranprotein Vac8p an der Vakuolenmembran anzusetzen und diese zu verformen (Wang et al., 1998; Catlett und Weisman, 1998). Ob diese Proteine auch bei der Mikroautophagocytose beteiligt sind, wurde bislang noch nicht untersucht.

4.3. Die Rolle von Aut- und Apg-Proteinen für die Mikroautophagocytose

Durch genetische Untersuchungen wurden Mutanten gefunden, die empfindlich gegen Hungerbedingungen sind bzw. die bestimmte cytosolische Proteine nicht mehr abbauen können (Tsukada und Ohsumi, 1993; Thumm et al., 1994). Werden diese Mutationen mit einem Defekt vakuolärer Proteasen kombiniert, so bilden die Mutanten, im Gegensatz zum Wildtyp, unter Hungerbedingungen keine autophagischen Körperchen. Inzwischen sind einige

der zugehörigen AUT- und APG-Gene kloniert und die entsprechenden Proteine charakterisiert. In dieser Arbeit wurden gegen eine Auswahl dieser Proteine Antisera hergestellt und gereinigt. Aut1p ist ein Protein unbekannter Funktion, das sowohl für den konstitutiven Cvt-Weg als für die durch Hunger induzierte Autophagocytose nötig ist (Schlumpberger et al., 1996). Apg6p ist ein peripheres Membranprotein, dessen humanes Homologes Beclin 1 als proapoptotischer Tumorsuppressor wirkt (Liang et al., 1999). Apg5p, Apg10p und Apg16p sind Bestandteil eines an das Ubiquitinsystem erinnernden Proteinkonjugationssystems: Apg5p wird durch Apg7p (Kim et al., 1999; Tanida et al., 1999) und Apg10p (Shintani et al., 1999) mit Apg12p (Mizushima et al., 1998) verknüpft und durch Apg16p dimerisiert (Mizushima et al., 1999). Die Funktion von Apg5p ist essentiell für die Bildung von Autophagosomen (George et al., 2000). Ein Homologes von Apg7p, Gsa7p, ist an dem mikroautophagischen Abbau von Peroxisomen in *Pichia pastoris* beteiligt (Kim et al., 1999).

Die gereinigten Antikörper gegen Aut1p, Apg5p, Apg6p, Apg10p und Apg16p wurden verwendet, um die Beteiligung dieser Aut- und Apg- Proteine an der Mikroautophagocytose zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß keiner der erhaltenen Antikörper die Mikroautophagocytose *in vitro* hemmen konnte. Dies kann selbstverständlich aus der Auswahl der Proteine resultieren oder auch technische Gründe haben. So wurde ein Teil der Antikörper durch Immunisierung mit denaturiertem Protein hergestellt, so daß das im *in vitro* Test vorliegende native Protein nicht notwendigerweise erkannt werden muß.

Wahrscheinlicher erscheint jedoch, daß die in genetischen Screens gefundenen an der Autophagocytose beteiligten Gene zwar für die Makroautophagocytose und möglicherweise die Regulation der Mikroautophagocytose, nicht aber für die letzten, *in vitro* gemessenen Schritte der Mikroautophagocytose nötig sind. Des weiteren könnten Antikörper gegen Apg5p, Apg10p und Apg16p möglicherweise die Bildung neuer Proteinkonjugate verhindern, nicht aber die Aktivität schon vorgebildeter, mit dem Cytosol in das Meßsystem eingebrachter Apg5p/Apg12p-Konjugate unterbinden.

Auch Ergebnisse von Sattler und Mayer (2000) geben Hinweise darauf, daß Mikro- und Makroautophagocytose nach verschiedenen Mechanismen ablaufen. So unterstützen Cytosole aus AUT- und APG-Mutanten die *in vitro*-Mikroautophagocytose, wenn auch mit gegenüber dem Wildtyp verringerter Effizienz. Des weiteren war die Mikroautophagocytose *in vitro* nicht abhängig von den t-SNARES Vam3p und Vam7p (Sattler und Mayer, 2000), die für die

Makroautophagocytose unerlässlich sind (Darsow et al., 1997; Sato et al., 1998).

Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, daß Mikro- und Makroautophagocytose mechanistisch unabhängig voneinander sind und folglich Antikörper gegen an der Makroautophagocytose beteiligte Proteine die Mikroautophagocytose nicht stören können.

4.4. Physiologische Funktion der Mikroautophagocytose

Die Unabhängigkeit der Mikroautophagocytose von Apg-Proteinen wirft auch ein Licht auf die quantitative Verteilung von Mikro- und Makroautophagocytose: Obwohl VAM3- oder APG-Mutanten noch zu Mikroautophagocytose fähig sein sollten, bilden sie dennoch keine autophagischen Körperchen. Die Makroautophagocytose muß also der Mikroautophagocytose quantitativ überlegen oder zumindest für die Induktion der Mikroautophagocytose nötig sein. Mikroautophagocytose ist also wahrscheinlich wenig bedeutend für den Proteintransport vom Cytoplasma in die Vakuole, da dieser schon durch die Blockade der Makroautophagocytose praktisch völlig zum Erliegen kommt. Vielmehr muß für die Mikroautophagocytose eine Rolle in der Homöostase der Vakuolenmembran gefordert werden. Dies würde auch die gemeinsame Induktion von Makro- und Mikroautophagocytose erklären: Wenn unter Hungerbedingungen vermehrt Membranen aus Autophagosomen der Vakuole zugeführt werden, müßte diese stark an Größe zunehmen. Der Abbau vakuolärer Membranen durch Mikroautophagocytose stellt einen Weg zur Regulation der Menge und Zusammensetzung vakuolärer Membranen dar: Nicht mehr benötigte Membranproteine und Lipide können aufgenommen und abgebaut werden. Dafür sprechen die elektronenmikroskopischen Befunde, wonach sich die aufgenommenen Membranen von der übrigen Vakuolenmembran schon morphologisch unterscheiden (Müller et al., 2000). Leider kann die Mikroautophagocytose erst dann unabhängig von der Makroautophagocytose *in vivo* untersucht werden, wenn Mutanten bekannt sind, die spezifisch für die Mikroautophagocytose defizient sind. Dies ist für ein anderes Modellsystem, die Hefe *Pichia pastoris*, schon gelungen. Verschiedene Mutationen konnten verschiedenen morphologisch definierten Stadien der Mikropexophagie zugeordnet werden (Sakai et al., 1998). Ob die damit assoziierten molekularen Ereignisse mit denen der Mikroautophagocytose in *Saccharomyces cerevisiae* identisch sind, bleibt jedoch offen.

4.5. Medizinische Bedeutung eines Systems zur Messung der Mikroautophagocytose *in vitro*

Saccharomyces cerevisiae hat sich aus mehreren Gründen als Modellorganismus zum Studium zellbiologischer Vorgänge bewährt: Hefe enthält als einfacher Einzeller die Proteine, die allen Eukaryonten gemeinsam sind, das „Kernproteom“, darunter auch zahlreiche Proteine, deren Mutation zu menschlichen Erkrankungen führt (Rubin et al., 2000; Costanzo et al., 2001); die Zusammensetzung wichtiger Multiproteinkomplexe blieb von der Hefe bis zu höheren Eukaryonten konserviert (Gavin et al., 2002); grundlegende zelluläre Vorgänge laufen in Hefe und höheren Zellen nach demselben Muster ab (Bock et al., 2001). Zur Mikroautophagocytose analoge Prozesse laufen in vielen eukaryotischen Zellen ab und haben Bedeutung für die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen (siehe 1.1., 1.3., Abb. 1).

Dazu zählt insbesondere die Sortierung von membranständigen Proteinen wie dem LDL-Rezeptor, dem IGF2-Rezeptor oder dem EGF-Rezeptor im "multivesicular body" (MVB) (Felder et al., 1990; Kobayashi et al., 1998). Diese Sortierungsvorgänge sind beim Antiphospholipidsyndrom, aber auch bei der Sphingolipidspeichererkrankung Niemann-Pick Typ C gestört (Kobayashi et al., 1999). Ein tieferer Einblick in diese Vorgänge könnte nicht nur diese Krankheiten verstehen helfen, sondern auch eine Manipulationen der Aktivität wichtiger Rezeptoren ermöglichen. Pharmaka, die deren Sortierung verhindern könnten, würden den Abbau dieser Rezeptoren verlangsamen und die Menge der Rezeptoren auf der Zellmembran erhöhen. Gelänge dies beispielsweise für LDL-Rezeptoren, wäre das ein neuer Ansatz zur Senkung des Serumcholesterolspiegels; die Verhinderung des Abbaus von Insulinrezeptoren könnte die periphere Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ 2 verringern. Ein *in vitro* System wie das der Mikroautophagocytose könnte bei der Identifizierung entsprechender Pharmaka helfen.

Die Sortierung im MVB ist nicht nur Vorbedingung für den Abbau von Membranproteinen, sondern auch für ihre Lokalisierung auf Exosomen. Diese sollen eine Rolle bei der Interaktion und Antigenpräsentation zwischen dendritischen Zellen, B-Zellen und T-Zellen spielen und immunstimulatorische Wirkung haben (Denzer et al., 2000; Théry et al., 2001). Eine Hemmung der Bildung von Exosomen durch Stören der Sortierung im MVB wäre ein möglicher Therapieansatz bei Autoimmunerkrankungen, auch hier könnten entsprechende Pharmaka *in vitro* gefunden werden. In diesem Zusammenhang ist die immunsuppressive

Wirkung von Rapamycin, einem der Hemmstoffe der *in vitro*-Mikroautophagocytose, erwähnenswert (Hidalgo und Rowinsky, 2000).

Die bisher genannten Beispiele für mögliche Anwendungen der Hemmstoffe der Mikroautophagocytose beruhen auf der Annahme, die Mikroautophagocytose laufe in Hefe analog zu entsprechenden Vorgängen in humanen Zellen ab. Jedoch ist auch die umgekehrte Annahme erlaubt, es gebe an der Mikroautophagocytose beteiligte Komponenten, die spezifisch für Pilze sind. Wären diese Komponenten gleichzeitig essentiell für die Pathogenität von Pilzen, so stellte die Messung der Mikroautophagocytose *in vitro* auch eine Möglichkeit dar, nach Antimykotika zu suchen. Beispiele hierfür sind Amphotericin und Nystatin, die seit Jahrzehnten als Antimykotika eingesetzt werden und die die Mikroautophagocytose *in vitro* hemmen.

5. Zusammenfassung

Die Messung der Mikroautophagocytose *in vitro* dient als Modellsystem für das Abschnüren von Vesikeln auf der luminalen Seite von Zellorganellen.

In dieser Arbeit konnten mehrere Inhibitoren dieser Reaktion gefunden werden: Latrunculin A, Cytochalasin B, Cytochalasin D, Twinfilin, Nystatin, Amphotericin B, FCCP, Valinomycin, GTP[γ S], Aristolochiasäure, K252a, Rapamycin. Die Identifizierung dieser Inhibitoren ergab Hinweise auf an der Mikroautophagocytose beteiligte Komponenten. Dazu zählen Actin, Ergosterol, das vakuoläre Membranpotential, G-Proteine, Phospholipasen und Proteinkinasen. Antikörper gegen Aut1p, Apg5p, Apg6p, Apg10p und Apg16p wurden hergestellt und ihre Wirkung auf die Mikroautophagocytose *in vitro* untersucht. Keiner dieser Antikörper konnte diese Reaktion inhibieren, was auf Unterschiede der molekularen Mechanismen von Makro- und Mikroautophagocytose hindeutet.

Das Verhalten von Actin im Verlauf der Mikroautophagocytose wurde *in vitro* biochemisch und *in vivo* fluoreszenz- sowie elektronenmikroskopisch untersucht; es bindet an Vakuolen und reichert sich an der Membran autophagischer Körperchen an.

Mit Hilfe der genannten niedermolekularen Inhibitoren der Mikroautophagocytose wurde die *in vitro*-Reaktion in vier Stadien aufgeteilt. Die letzte dieser Stufen, ein Zustand, in dem die Vakuolen kompetent für eine schnelle und auch bei tiefen Temperaturen ablaufende Aufnahme des umgebenden Mediums sind, kann nur erreicht werden, wenn die vorhergehenden Stadien durchlaufen wurden. Da die für die einzelnen Stufen spezifischen Hemmstoffe bekannte Zielstrukturen angreifen, konnten den kinetisch definierten Stadien molekulare Ereignisse zugeordnet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse geben nicht nur Aufschluß über eine grundlegende zelluläre Reaktion, sondern zeigen auch auf, wie diese pharmakologisch beeinflusst werden kann. Dies könnte von Bedeutung sein für die Suche nach Antimykotika, aber auch nach Medikamenten zur Behandlung von Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen.

6. Literatur

Abeliovich, H. und Klionsky, D.J. (2001) Autophagy in yeast: Mechanistic insights and physiological function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 463-479

Adams, A.E., Johnson, D.I., Lonnecker, R.M., Sloat, B.F. und Pringle, J.R. (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 111, 131-142

Alarcon, C.M., Heitman, J. und Cardenas, M.E. (1999) Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 2531-2546

Anglade, P., Vyas, S., Hirsch, E.C. und Agid, Y. (1997) Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histology and Histopathology*, 12, 603-610

Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P. und Drubin, D.G. (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor Latrunculin-A. *The Journal of Cell Biology*, 137, 399-416

Baba, M., Ohsumi, M. und Ohsumi, Y. (1995) Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Structure and Function*, 20, 465-471

Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. und Ohsumi, Y. (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *The Journal of Cell Biology*, 124, 903-913

Basset, D.F. Jr., Boguski, M.S. und Hieter, P. (1996) Yeast genes and human disease. *Nature* 379, 589-590

Berggren M.I., Gallegos A., Dressler, L.A., Modest E.J. und Powis G. (1993) Inhibition of the signalling enzyme phosphatidylinositol-3-kinase by antitumor ether lipid analogues. *Cancer Research*, 53, 4297-4302

Bhuiyan, M.S.A., Ito, Y., Nakamura, A., Tanaka, N., Fujita, K., Fukui, H. und Takegawa, K. (1999) Nystatin effects on vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1075-1082

Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A. und Scheller, R.H. (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, 409, 839-841

Botstein, D., Amberg, D., Mulholland, J., Huffaker, T., Adams, A., Drubin, D. und Stearns, T. (1997) The yeast cytoskeleton, in: Pringle, J. R., Broach, J. R. und Jones, E. W.: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Band 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, USA

Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U. und Schulte-Hermann, R. (2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926, 1-12

- Bursch, W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 8, 545-548
- Capogna, M., McKinney, R.A., O'Connor, V., Gahwiler, B.H. und Thompson, S.M. (1997) Ca^{2+} or Sr^{2+} partially rescues synaptic transmission in hippocampal cultures treated with botulinum toxin A and C, but not tetanus toxin. *Journal of Neuroscience*, 17, 7190-7202
- Cardenas, M.E., Lim, E. und Heitman, J. (1995) Mutations that perturb Cyclophilin A ligand binding pocket confer cyclosporin A resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 20997-201002
- Catlett, N.L. und Weisman, L.S. (1998) The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America*, 95, 14799-14804
- Chiang, H.L., Schekman, R. und Hamamoto, S. (1996) Selective uptake of cytosolic, peroxisomal, and plasma membrane proteins into the yeast lysosome for degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 9934-9941
- Conradt, B., Haas, A. und Wickner, W. (1994) Determination of four biochemically distinct, sequential stages during vacuole inheritance *in vitro*. *The Journal of Cell Biology*, 126, 99-110
- Costanzo, M.C., Crawford, M.E., Hirschman, J.E., Kranz, J.E., Olsen, P., Robertson, L.S., Skrzypek, M., Braun, B.R., Hopkins, K.L., Kondu, P., Lengieza, C., Lew-Smith, J.E., Tillberg, M. und Garrels, J.I. (2001) YPDTM, PombePDTM and WormPDTM: model organism volumes of the BioKnowledgeTM Library, an integrated resource for protein information. *Nucleic Acids Research*, 29, 75-79
- Crowell, P.L., Chang, R.R., Ren, Z., Elson, C.E. und Gould, M.N. (1991) Selective inhibition of isoprenylation of 21-26 kDa proteins by the anticarcinogen d-Limonene and its metabolites. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 17679-17685
- Cuervo, A.M. und Dice, J.F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273, 501-503
- Darsow, T., Rieder, S.K. und Emr, S.D. (1997) A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *The Journal of Cell Biology*, 138, 517-529
- Daum, G. (2000) The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a eukaryotic model for cell biology. *Microscopy Research & Technique*, 51, 493-495
- de Chaffoy de Courcelles D., Roevens P., Van Belle H., Kennis L., Somers Y. und De Clerck F. (1989) The role of endogenously formed diacylglycerol in the propagation and termination of platelet activation. A biochemical and functional analysis using the novel diacylglycerol kinase inhibitor, R 59 949. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 3274-3285
- Denzer, K. Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F.G., Stoorvogel, W. und Geuze, H.J. (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 113, 3365-3374

- de Waal, E.J., Vreeling-Sindelarova, H., Schellens, J.P., Houtkooper, J.M. und James, J. (1986) Quantitative changes in the lysosomal vacuolar system of rat hepatocytes during short-term starvation. A morphometric analysis with special reference to macro- and microautophagy. *Cell and Tissue Research*, 243, 641-648
- Doyle, T. und Botstein, D. (1995) Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America*, 93, 3886-3891
- Dunn, W.A. Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in Cell Biology*, 4, 139-143
- Dürr, M., Boller, T. und Wiemken, A. (1975) Polybase induced lysis of yeast spheroplasts. *Archives of Microbiology*, 105, 319-327
- Eitzen, G., Thorngren, N. und Wickner, W. (2001) Rho1p and Cdc42 act after Ypt7p to regulate vacuole docking. *The EMBO Journal*, 20, 5650-5656
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. und Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 20121-20127
- Fedorko, M.F., Hirsch, J.G. und Cohn, Z.A. (1968) Autophagic vacuoles produced *in vitro*. *The Journal of Cell Biology*, 38, 377-386
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. und Hopkins, C.R. (1990) Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*, 61, 623-634
- Fernandez-Borja, M., Wubbolts, R., Calafat, J., Janssen, H., Divecha, N., Dusseljee, S. und Neefjes, J. (1999) Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Current Biology*, 9, 55-58
- Fryberg, M., Oehlschlager, A.C. und Unrau, A.M. (1974) Sterol biosynthesis in antibiotic-resistant yeast: Nystatin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 160, 83-89
- Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. und Hopkins, C.R. (1993) Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of Cell Biology*, 120, 77-83
- Gavin, A.-C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.-A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. und Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415, 141-147

- Garcia A.M., Rowell C., Ackermann K., Kowalczyk J.J. und Lewis M.D. (1993) Peptidomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268,18415-18418
- George, M.D., Baba, M., Scott, S.V., Mizushima, N., Garrison, B.S., Ohsumi, Y. und Klionsky, D.J. (2000) Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 969-982
- Goode, B., Drubin, D. und Lappalainen, P. (1998) Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein. *The Journal of Cell Biology*, 142, 723-733
- Grant, A.M., Hanson, P.K., Malone, L. und Nichols, J.W. (2001) NBD-labeled phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are internalized by transbilayer transport across the yeast plasma membrane. *Traffic*, 2, 37-50
- Gupta, R.S. (1983) Podophyllin-resistant mutants of chinese hamster ovary cells: cross-resistance studies with various microtubule inhibitors and podophyllotoxin analogues. *Cancer Research*, 43, 505-512
- Haas, A. (1995) A quantitative assay to measure homotypic vacuole fusion *in vitro*. *Methods in Cell Science*, 17, 283-294
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J. und Sixma, J.J. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha granules. *Blood*, 94, 3791-3799
- Hidalgo, M. und Rowinsky, F.K. (2000) The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 19, 6680-6686
- Hill, K.L., Catlett, N.L. und Weisman, L.S. (1996) Actin and myosin function in directed vacuole movement during yeast cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 135, 1535-1549
- Hirsch, J.G., Fedorko, M.E. und Cohn, Z.A. (1968) Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytotic vacuoles in macrophages. *The Journal of Cell Biology*, 38, 629-632
- Holen, I., Gordon, P.B. und Seglen, P.O. (1993) Inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid and other protein phosphatase inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 215, 113-122
- Holthuis, J.C., Pomorski, T., Raggars, R.J., Sprong, H. und van Meer, G. (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiological Reviews*, 81, 1689-1723
- Jahn, R. und Südhoff, T.C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annual Reviews in Biochemistry* 68, 863-911

- Jeffrey, M., Scott, J.R., Williams, A. und Fraser, H. (1992) Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathologica*, 84, 559-569
- Johnson, D.I. (1999) Cdc42: an essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 54-105
- Jones, E.W., Webb, G.C. und Hiller, M.A. (1997) Biogenesis and function of the yeast vacuole, in: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, Band 3, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, N. und Ohsumi, Y. (2000) TOR-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of Cell Biology*, 150, 1507-1513
- Kato, M. und Wickner, W. (2001) Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. *The EMBO Journal*, 20, 4035-4040
- Katzmann, D.J., Babst, M. und 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
- Kim, J., Dalton, V.M., Eggerton, K.P., Scott, S.V. und Klionsky, D.J. (1999) Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1337-1351
- Klionsky D.J. und Emr, S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290, 1717-1721
- Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R.G. und Gruenberg, J. (1999) Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology*, 1, 113-118
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K.S., de Moerloose, P., Parton, R.G. und Gruenberg, J. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*, 392, 193-197
- Krstic, R. V. (1984) *Illustrated encyclopedia of human histology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biophysical and Biochemical Methods*, 10, 203-209
- Lappalainen, P., Fedorov, E.V., Fedorov, A.A., Almo, S. C. und Drubin, D.G. (1997) Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *The EMBO Journal*, 16, 5520-5530
- Lentz, B.R., Carpenter, T.J. und Alford, D.R. (1987) Spontaneous fusion of phosphatidylcholine small unilamellar vesicles in the fluid phase. *Biochemistry*, 26, 5389-5397

- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. und Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1*. *Nature*, 402, 672-676
- Lobie, P.E., Sadir, R., Graichen, R., Mertani, H.C. und Morel, G. (1999) Caveolar internalization of growth hormone. *Experimental Cell Research*, 246, 47-55
- Lombard, D. und Dennis, E.A. (1985) Cobra venom phospholipase A2 inhibition by manoalide. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 7234-7240
- Mayer, A., Schleglmann, D., Dove, S., Glatz, A., Wickner, W. und Haas, A. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 807-817
- Metzler, G., Schaumburg-Lever, G., Fehrenbacher, B. und Moller, H. (1992) Ultrastructural localization of actin in normal human skin. *Archives of dermatological research*. 284, 242-245
- Mizushima, N., Noda, T. und Ohsumi, Y. (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO Journal* 18, 3888-3896
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M. und Ohsumi, Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-398
- Mortimore, G.E., Hutson, N.J. und Surmacz, C.A. (1983) Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America*, 80, 2179-2183
- Müller, O., Bayer, M.J., Peters, C., Andersen, J.S., Mann, M. und Mayer, A. (2002) The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V_0 trans-complex formation. *The EMBO Journal*, 21, 259-269
- Müller, O., Johnson, D.I. und Mayer, A. (2001) Cdc42p functions at the docking stage of yeast vacuole membrane fusion. *The EMBO Journal*, 20, 5657-5665
- Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H. und Mayer, A. (2000) Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *The Journal of Cell Biology*, 151, 519-528
- Neiman, A.M. (1998) Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 140, 29-37
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J.E., Oh, S.J., Koga, Y., Sue, C. M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S. und Hirano, M. (2000) Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon's disease). *Nature* 406, 906-910
- Noda, T. und Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 3963-3966

- Odorizzi, G., Babst, M. und Emr, S.D. (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-Kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell*, 95, 847-858
- Pan, B.T. und Johnstone, R.M. (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33, 967-977
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. und Johnstone, R.M. (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 101, 942-948
- Pelham, H.R.B. (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annual Reviews in Cell Biology*, 5, 1-23
- Peters, C., Bayer, M.J., Bühler S., Andersen J.S., Mann M. und Mayer A. (2001) Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*, 409, 581-588
- Piper, R.C. und Luzio, J.P. (2001) Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic*, 2, 612-621
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C. und Desaynard, C. (1997) Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 2631-2645
- Raught, B., Gingras, A.C. und Sonenberg, N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98, 7073-7044
- Rosenthal, M.D., Vishwanath, B.S. und Franson, R.C. (1989) Effects of aristolochic acid on phospholipase A2 activity and arachidonate metabolism of human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1001, 1-8
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Crachvik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S.B., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J.M., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Troy Littleton, J., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P., Pickeral, O.K., Shue, C., Vossball, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Zhong, F., Zhong, W., Gibbs, R., Craig Venter, J., Adams, M.D. und Lewis, S. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287, 2204-2215
- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G.A. und Subramani, S. (1998) Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. *The Journal of Cell Biology*, 141, 625-636
- Sato, T.K., Darsow, T. und Emr, S.D. (1998) Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 5308-5319

- Sattler, T. und Mayer, A. (2000) Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation. *The Journal of Cell Biology*, 151, 529-538
- Sauvé, D.M., Ho, D.T. und Roberge, M. (1995) Concentration of dilute protein for gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 226, 382-383
- Schlumpberger, M., Schaeffeler, E., Straub, M., Bredschneider, M., Wolf, D.H. und Thumm, M. (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 179, 1068-1076
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B. und Söling, H.-D. (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, 401, 133-141
- Schneider, S. W. (2001) Kiss and run mechanism in exocytosis. *Journal of Membrane Biology*, 181, 67-76
- Scott, S.V. und Klionsky, D.J. (1998) Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 523-529
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T. und Ohsumi, Y. (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *The EMBO Journal*, 18, 5234-5241
- Simons, K. und Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science*, 290, 1721-1725
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* 185, 60-89
- Suurkuusk, J., Lentz, B.R., Barenholz, Y., Biltonen, R.L. und Thompson, T.E. (1976) A calorimetric and fluorescent probe study of the gel-liquid crystalline phase transition in small, single-lamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, 15, 1393-1401
- Takano-Ohmuro, H., Mukaida, M., Kominami, E. und Morioka, K. (2000) Autophagy in embryonic cells: its role in maturation. *European Journal of Cell Biology*, 79, 759-764
- Takano-Ohmuro, H., Mukaida, M. und Morioka, K. (1996) Distribution of actin, myosin and spectrin during enucleation in erythroid cells of hamster embryo. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 34, 95-107
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. und Tomita, F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{2+} -dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135, 397-402
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K. und Saftig, P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406, 902-906

- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y. und Kominami, E. (1999) Apg7p/Cvt7p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1367-1379
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. und Amigorena, S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology*, 166, 7309-7318
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. und Wolf, D. H. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 349, 275-280
- Tsukada, M. und Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 333, 169
- Valtorta, F., Meldolesi, J. und Fesce, R. (2001) Synaptic vesicles: Is kissing a matter of competence? *Trends in Cell Biology*, 11, 324-328
- Vidal, M., Mangeat, P. und Hoekstra, D. (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *Journal of Cell Science*, 110, 1867-1877
- Wang, Y.-X., Catlett, N.L. und Weisman, L.S. (1998) Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *The Journal of Cell Biology*, 140, 1063-1074
- Wiemken, A., Schellenberg, M. und Urech, K. (1979) Vacuoles: The sole compartment of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)? *Archives of Microbiology*, 123, 23-35
- Wilschut, J., Duzgunes, N., Hoekstra, D. und Papahadjopoulos, D. (1985) Modulation of membrane fusion by membrane fluidity: temperature dependence of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry*, 24, 8-14
- Yule, D.L. und Williams, J.A. (1992) U73122 inhibits Ca^{2+} oscillations in response to cholecystinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 13830-13835

Lebenslauf

Joachim Bernd Kunz,
geboren am 21.3.1974 in Karlsruhe

1980-1984 Grundschule Bruchhausen

1984-1993 Eichendorff-Gymnasium Ettlingen, Abitur

1993-1994 Zivildienst im Altenpflegeheim Stephanus-Stift, Ettlingen

1994-1999 Studium der Biochemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1997 Vordiplom

1997 Forschungsaufenthalt bei G.A.M. Cross, Laboratory of Molecular Parasitology, Rockefeller University, New York

1999 Diplom; Diplomarbeit „Biochemische Charakterisierung von Sec18p/NSF und seinen Wechselwirkungen mit der Hefevakuole“ bei Dr.A. Mayer, Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen

1996-2002 Studium der Humanmedizin

1996-2001 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1998 Ärztliche Vorprüfung

Famulaturen:

Medizinische Klinik III (Hämatologie/Onkologie), Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München

Praxis Dr. C. Wojaczek (Internist), München

Universitäts-Hautklinik Tübingen

Neurologische Klinik der Universität Tübingen

1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation

2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Wechsel an die Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,

2001/2002 Praktisches Jahr:

Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Schwetzingen, Abteilung für Kardiologie (PD Dr. Th. Beyer) und Abteilung für Gastroenterologie (Prof. Dr. B. Simon)

Chirurgie am Universitätsklinikum Heidelberg, Sektion Gefäßchirurgie (Prof. Dr. J.-R. Allenberg) und Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Unfallchirurgie und Poliklinik (Prof. Dr. M. Büchler)

Dermatologie an der Universitätshautklinik Heidelberg (Prof. Dr. D. Petzold)

1996-2002 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes