

**Untersuchung der Mikroautophagocytose  
in *Saccharomyces cerevisiae***

**Dissertation**

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Claudia Vera Dangelmayr**

aus Fürth / Bayern

2004

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2004

Dekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerd Jürgens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Mayer

## Danke....

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Mayer am Friedrich Miescher-Laboratorium der Max Planck-Gesellschaft in Tübingen angefertigt. Prof. Dr. Andreas Mayer danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit. Bei Prof. Dr. Gerd Jürgens möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Heinz Schwarz, sowie Brigitte Sailer, Gertrud Scherer und Ursula Müller von der EM-Abteilung des Max Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie danke ich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Experimenten. Christian Ungermann aus Heidelberg und Harald Stenmark aus Oslo danke ich für die schnelle und freundliche Bereitstellung einiger Plasmidkonstrukte.

Ein großes Dankeschön auch an Christa Baradoy, Rahmiye Kürkcü, Veronika Hissung, Hannelore Müller und Brigitte Kittel ohne deren Tatkraft bei der Versorgung und Entsorgung von Labormaterialien sicher kein so effektives Arbeiten möglich gewesen wäre.

Meinen ehemaligen und aktuellen Laborkollegen danke ich für die Tipps und Anregungen zu meiner Arbeit und für die netten Stunden, die wir beim Billard und bei anderen Freizeitaktivitäten miteinander zugebracht haben.

Für die schnelle Durchsicht und Anregungen zu dieser Arbeit möchte ich mich bei Anja Apel, Andreas Uttenweiler und vor allem bei Tobias Pacher bedanken.

Schließlich möchte ich noch meinen Freunden, meiner Familie und besonders Tobias für die schöne Zeit und die Unterstützung danken, die sie mir immer entgegengebracht haben.



# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Bedeutung der Autophagocytose für Höhere Organismen.....	3
2.2	Wege zur Vakuole.....	4
2.3	Makroautophagocytose in <i>S.cerevisiae</i> .....	6
2.4	Mikroautophagocytose in <i>S.cerevisiae</i> .....	9
2.5	Spezialfälle der Mikroautophagocytose.....	12
2.6	Zielsetzung.....	15
3	Ergebnisse.....	16
3.1	Mikroskopische Mikroautophagocytose-Screens.....	16
3.2	Mikroautophagocytose <i>in vitro</i> : Luciferase-Aufnahme.....	21
3.2.1	□stp22-Vakuolen.....	21
3.2.2	□fab1- und □vps34-Vakuolen.....	24
3.2.3	Inhibitorstudien: Vps34-Inhibitoren.....	26
3.2.4	Aufreinigung von Proteininhibitoren und Einsatz im <i>in vitro</i> -Luciferase-Aufnahme Assay.....	28
3.2.5	Kinetiken der <i>in vitro</i> -Luciferase-Aufnahme.....	32
3.3	Wirkung der Vps34-Inhibitoren auf ganze Zellen und Lokalisierung von PI3P <i>in vivo</i> .....	35
3.3.1	Wirkung der VPS34-Inhibitoren auf die Bildung Autophagischer Schläuche.....	35
3.3.2	PI3P-Lokalisierung auf Kunststoffschnitten.....	36
3.3.3	Expression von eGFP-FYVE <sub>2</sub> in Hefen.....	40
3.4	Etablierung eines <i>in vivo</i> Nachweises der Mikroautophagocytose in <i>S.cerevisiae</i> .....	49
3.4.1	Nach Hungerinduktion findet ein schneller Abbau des membrangebundenen eGFP-FYVE <sub>2</sub> statt.....	50
3.4.2	eGFP-FYVE <sub>2</sub> -Abbau erfolgt durch vakuoläre Proteasen.....	51
3.4.3	Expression eGFP-FYVE <sub>2</sub> in Hefemutanten.....	54
3.5	Ist das Protein Stp22 aktiv an der Mikroautophagocytose beteiligt?.....	57
3.6	Ausblick: Mikroautophagocytose als Lipid-vermittelter Prozess.....	61
	Extraktion der Vakuolen mit Lipid-Komplexbildnern.....	61
4	Diskussion.....	64
4.1	Wie wird die Größe einer Hefevakuole reguliert?.....	64
4.2	Etablierung eines <i>in vivo</i> -Assay für Mikro- und Makroautophagocytose.....	68
4.3	Mikroautophagocytose $\neq$ Makroautophagocytose.....	70
4.4	Mikroautophagocytose $\neq$ MVB-Einstülpung.....	72
4.5	Ist PI3P direkt oder indirekt an der Mikroautophagocytose beteiligt?.....	74
4.6	Lipide und ihre Eigenschaften in Membranen.....	76
4.7	Ausblick.....	79

5	Materialien und Methoden .....	80
5.1	Materialien .....	80
5.1.1	Hefe- und Bakterienstämme.....	80
5.1.2	Chemikalien und Reagenzien, Medien .....	82
5.1.3	Molekularbiologisches Material .....	83
5.2	Methoden.....	86
5.2.1	Molekularbiologie .....	86
5.2.2	Hefetransformationen .....	89
5.2.3	Deletionsmutanten in <i>S.cerevisiae</i> .....	91
5.2.4	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	92
5.2.5	Elektronenmikroskopie.....	94
5.2.6	<i>in vivo</i> pH-Bestimmung: CDCFDA- und CFDA-Färbung.....	97
5.2.7	Cytosolpräparation aus <i>S.cerevisiae</i> .....	98
5.2.8	Vakuolenpräparation.....	99
5.2.9	<i>In vitro</i> Protonenpump-Assay .....	100
5.2.10	<i>In vitro</i> Microautophagocytose: Luciferase-Aufnahme-Assay.....	101
5.2.11	Proteinexpression in <i>E.coli</i> und Proteinreinigung .....	105
5.2.12	Expression und Abbau von eGFP-FYVE <sub>2</sub> als <i>in vivo</i> -Assay für Mikroautophagocytose... .....	108
5.2.13	Herstellung von Protein-Extrakten aus <i>S.cerevisiae</i> .....	109
5.2.14	Standard-Methoden zum Protein-Nachweis .....	109
6	Literaturverzeichnis .....	112
7	Anhang.....	118

## Tabellen

Tabelle 3-1: Charakterisierung der vakuolären Eigenschaften von Hefedeletionsmutanten (BY4742).....	19
Tabelle 3-2: Lokalisierung von PI3P in Kunststoffschnitten von Hefezellen.....	36
Tabelle 5-1: Hefestämme.....	80
Tabelle 5-2: Eingesetzte PCR-Primer.....	84
Tabelle 5-3: Eingesetzte Plasmide.....	85
Tabelle 5-4: Thermocycler-Programm für die „Colony-PCR“ auf Hefezellen.....	89
Tabelle 5-5: Fluoreszenzfiltersätze für die Mikroskopie.....	92
Tabelle 5-6: Fixierung und Substitution von Hefen für die Elektronenmikroskopie.....	95
Tabelle 5-7: Schema zur Affinitätsmarkierung von Kunststoffschnitten mit GST-FYVE <sub>2</sub> .....	96
Liste 1: Hefestämme <i>S.cerevisiae</i> von Euroscarf, haploide Deletionsmutanten für den ersten mikroskopischen Screen nach Mutanten in der Bildung mikroautophagischer Schläuche. .....	118
Liste 2: Hefestämme <i>S.cerevisiae</i> , von Euroscarf bezogen, haploid.....	119

# Abbildungen

Abb. 2-1: Schematische Darstellung der verschiedenen Vesikel-vermittelten Transportwege zur Hefevakuole.....	5
Abb. 2-2: Modell der Autophagosomen-Bildung in Säugerzellen.....	8
Abb. 2-3: Schlauförmige Einstülpungen der Hefevakuolenmembran in lebenden Zellen: Autophagische Schläuche.....	9
Abb. 2-4: Verteilung von Transmembrankomplexen entlang der Autophagischen Schläuche.....	11
Abb. 2-5: Morphologie der Autophagocytose-, Pexophagie- und Cvt-Wege in Hefe.....	13
Abb. 3-1: FM4-64-Färbung der Wildtypstämme BMA64 und BY4742.....	17
Abb. 3-2: BY4742 $\Delta$ stp22.....	23
Abb. 3-3: BY4742 $\Delta$ vps34, $\Delta$ fab1, sowie FAB1 und fab1-2.....	25
Abb. 3-4: Vps34-Inhibitoren, Titration im <i>in vitro</i> Luciferase-Aufnahme-Assay.....	27
Abb. 3-5: SDS-PAGE der gereinigten Proteindomänen.....	30
Abb. 3-6: Proteindomänen als Inhibitoren im Luciferase-Aufnahme-Assay.....	31
Abb. 3-7: Kinetiken der <i>in vitro</i> Luciferase-Aufnahme.....	34
Abb. 3-8: Wirkung der Vps34-Inhibitoren auf die Bildung autophagischer Einstülpungen <i>in vivo</i> .....	36
Abb. 3-9: Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie. CRY1 oder CRY1 $\Delta$ vps34 nach 4 h in Stickstoffmangelmedium.....	39
Abb. 3-10: Expression von eGFP-Fusionsproteinen in <i>S.cerevisiae</i> CRY1 oder CRY1 $\Delta$ vps34.....	41
Abb. 3-11: Verteilung der Fluoreszenzstrukturen bei Expression von eGFP-FYVE <sub>2</sub> .....	44
Abb. 3-12: Quantitative Western Blot-Analyse der eGFP-FYVE <sub>2</sub> -exprimierenden Hefestämme.....	47
Abb. 3-13: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität auf Konfokalen Aufnahmen.....	49
Abb. 3-14: Abbau von eGFP-FYVE <sub>2</sub> in Hefezellen bei Stickstoffmangel.....	50
Abb. 3-15: eGFP-FYVE <sub>2</sub> -Abbau in Protease-negativen Hefestämmen.....	51
Abb. 3-16: Die Wirkung der Vps34-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 auf den Abbau von eGFP-FYVE <sub>2</sub> <i>in vivo</i> .....	53
Abb. 3-17: eGFP-FYVE <sub>2</sub> -enthaltende Autophagische Körperchen in Proteinase-negativen Hefen. ....	54
Abb. 3-18: Abbau von eGFP-FYVE <sub>2</sub> oder eGFP-FYVE <sub>2</sub> * (FYVE*) bei Stickstoffmangel zu eGFP in verschiedenen Deletionsmutanten im BY4742-Hintergrund.....	55
Abb. 3-19: Coexpression von YFP-FYVE <sub>2</sub> (gelbe Fluoreszenz) und CFP, CFP-stp22 oder CFP-vps4 (blaue Fluoreszenz) im Wildtyp-Hefestamm CRY1.....	60
Abb. 3-20: Extraktion mit 7,5 mM $\alpha$ -Cyclodextrin (alpha-CD) reduziert die Luciferase-Aufnahme reisolierter Vakuolen, während die Vorinkubation mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M-beta-CD) darauf keinen Einfluss hat.....	62
Abb. 4-1: Stufenschema der Mikroautophagocytose – <i>in vitro</i> gewonnen aus kinetischen Untersuchungen.....	67
Abb. 4-2: Modell der Bildung Autophagischer Schläuche.....	77
Anhang: Elektronenmikroskopiebilder aus Abbildung 3-9.....	121

## Abkürzungen

ALP	Alkalische Phosphatase, Pho8p, Markerenzym der Vakuolenmembran in Hefe
BSA	Bovine Serum Albumine
CDCFDA	Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein Di-Acetate
CFDA	5-Carboxy-Fluorescein Di-Acetat
ConcA	Concanamycin A
CPY	Carboxypeptidase Y, luminales Markerprotein der Hefevakuole
DTT	Dithiothreitol
FYVE <sub>2</sub>	Zwei fusionierte FYVE-Domänen aus Maus-Hrs ( <u>H</u> epatocyte growth factor <u>r</u> egulated tyrosine kinase <u>s</u> ubstrate)
FYVE <sub>2</sub> *	zwei FYVE-Domänen mit je (C215S)
GFP	Green Fluorescent Protein aus <i>Aequoria victoria</i> , besitzt starke Autofluoreszenz
h	Stunde
HRP	Horse Radish Peroxidase : Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
min	Minuten
MVB	„Multivesicular Body“ – Prävakuoläres Kompartiment
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI3,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
PI4P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PI4,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluorid
PX	PX-Domäne des Hefeproteins VAM7 - Aminosäuren 1-122
PX*	PX-Domäne des Hefeproteins VAM7 – Aminosäuren 1-122 (Y42A)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
RT	Raumtemperatur
Upm	Umdrehungen pro Minute
vATPase	vakuoläre Protonenpumpe, bestehend aus der V0-Einheit in der Vakuolenmembran und dem V1-Komplex, der cytosolisch mit V0 wechselwirkt.
WT	Wildtyp



# 1 Zusammenfassung

Einen der wichtigsten Mechanismen zur Anpassung an widrige Bedingungen für eukaryotische Zellen stellt die Autophagocytose dar. Sie bietet den Zellen die Möglichkeit, durch gezieltes Recycling cytosolischen Materials die Zelle auf eine Überdauerung des Nahrungsmangels vorzubereiten. Bei der Mikroautophagocytose handelt es sich um einen Aspekt der Autophagocytose, der bislang im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durch bildgebende Verfahren und durch Etablierung eines *in vitro* Nachweises beschrieben wurde. Es konnte noch nicht gezeigt werden, welche Zellkomponenten direkt an der Einstülpung der Vakuolenmembran beteiligt sind und wie die Abschnürung von Vesikeln ins Innere eines Organells hinein erfolgen kann.

In dieser Arbeit wurde durch Expression des Phosphatidylinositol-3-Phosphat bindenden Proteins FYVE<sub>2</sub> der erste Nachweis für eine direkte Einstülpung der Vakuolenmembran und für den Abbau dieses Membranabschnitts im Vakuolenlumen erbracht. Durch Einsatz von Makroautophagocytose-Mutanten in diesem Assay konnte gezeigt werden, dass Mikro- und Makroautophagocytose mechanistisch unterscheidbar sind, dass aber das Ausmaß des mikroautophagischen Membranabbaus abhängig ist vom makroautophagischen Membrantransport zur Vakuole. Die für die Mikroautophagocytose nötige Maschinerie ist unabhängig von Komponenten der Sortierung am „Multivesicular Body“.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Lipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat *in vitro* notwendig für den mikroautophagischen Membranabbau ist und dass es *in vivo* in Autophagischen Schläuchen angereichert wird. Durch Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> konnte indirekt eine laterale Sortierung des Lipids in der Vakuolenmembran und der Transport des Lipids unter Stickstoffmangelbedingungen in das Vakuolenlumen gezeigt werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* um einen rein Lipid-vermittelten Prozess handelt.

An der Mikroautophagocytose beteiligte Proteine konnten durch Einsatz von Hefedeletionsmutanten nicht identifiziert werden. Durch Experimente mit

niedermolekularen Inhibitoren konnten Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Proteine an der Bildung Autophagischer Schläuche und beim Abbau der abgeschnürten Vesikel gewonnen werden. Nach (Sattler and Mayer 2000; Kunz 2002) und aus den Ergebnissen dieser Arbeit wurde folgendes Modell für die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* entworfen: durch Stickstoffmangel wird eine laterale Sortierung der Membranlipide und die Einstülpung der Hefevakuole induziert. Diese Strukturänderung erfolgt in Abhängigkeit von Stickstoffmangelbedingungen und kann durch GTP[S inhiert werden. Das Lipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat ist essentiell für die Abschnürung von Vesikeln ins Vakuolenlumen. Durch Beeinflussung der Lipidkonzentration oder des Protonengradienten der Vakuolenmembran wird diese Abschnürung verhindert. Vakuoläre Lipasen und Proteasen bauen die Vesikel im Lumen ab und stellen die Abbauprodukte für eine Wiederverwertung zur Verfügung.

## 2 Einleitung

### 2.1 Bedeutung der Autophagocytose für Höhere Organismen

Unter günstigen Bedingungen wachsen und vermehren sich Zellen, während unter Stressbedingungen wie etwa Nahrungsmangel, eine gezielte Reorganisation der Zellkomponenten stattfinden muss, damit die Zellen diese widrigen Bedingungen überleben können. Als Antwort auf Stickstoffmangel erfolgt z.B. ein gezielter Umbau der Zelle, bei dem durch Autophagocytose unspezifisch Teile des Cytosols in das Lysosom transportiert und dort abgebaut werden. Die Abbauprodukte können der Neusynthese im Cytosol zugeführt oder gespeichert werden. Dieser Prozess und die daran beteiligten Proteine sind hochkonserviert von Hefezellen bis hin zu Säugern. In allen untersuchten kernhaltigen Zellen wurde Autophagocytose beobachtet, zum Beispiel bei hungernden Tieren in der Leber. Durch elektronenmikroskopische Studien wurden zwei Prinzipien der Autophagocytose beschrieben. Zum einen gibt es die sogenannte Mikroautophagocytose, bei der durch direkte Einstülpung der Lysosomenmembran ein Teil des Cytosols aufgenommen wird, zum anderen die Makroautophagocytose, bei der durch neu entstehende Vesikel Teile des Cytosols eingeschlossen werden. Diese von einer Doppelmembran umhüllten Vesikel werden Autophagosomen genannt. Ihre äußere Membran fusioniert mit der Lysosomenmembran und entlässt den von einer einfachen Membran umhüllten Vesikel ins Lysosomenlumen, woraufhin dieser dort abgebaut wird (Reggiori and Klionsky 2002; Klionsky and Emr 2000; Seglen and Bohley 1992). Durch verschiedene genetische Screens in der Hefe *S.cerevisiae* konnten viele Komponenten, die an der Makroautophagocytose beteiligt sind, charakterisiert werden (s. 2.3).

Bei verschiedenen Krankheitsbildern wurde die Anreicherung autophagischer Vakuolen beschrieben (Ogier-Denis and Codogno 2003). Dazu gehören Muskelatrophien, Gefäß- und Skelett-Myopathien, sowie die neurodegenerativen Krankheiten Chorea Huntington, Parkinson und Alzheimer. Die autophagische Aktivität ist bei diesen Krankheitsbildern nicht mehr ausreichend, um die

pathologischen Proteine wie zum Beispiel Huntingtin, durch Abbau im Lysosom zu entfernen. Bei Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien konnte beobachtet werden, dass zum Beispiel bei schwacher Bestrahlung von Brustkrebszellen durch Hemmung der Autophagocytose eine bessere Effizienz in der Tumorbekämpfung erreicht werden kann. Andererseits spielt der programmierte Zelltod durch Autophagocytose (Typ II) eine Rolle bei der Verhinderung der Tumorigenese.

Um auf zellbiologische Vorgänge zur Bekämpfung von Krankheiten gezielt Einfluss nehmen zu können oder um die Entstehung von Krebs zu verhindern, ist ein grundlegendes Verständnis auf molekularer Ebene Voraussetzung. Die Untersuchung und Charakterisierung dieser universellen Mechanismen anhand einfacherer Modellsysteme wie dem Lysosom der Hefe zur Untersuchung der Autophagocytose sind hierfür das Mittel der Wahl.

## **2.2 Wege zur Vakuole**

Das lytische Kompartiment der Hefezellen wird Vakuole genannt. Sie stellt das Zielorganell dar für endocytisiertes Material, für das Recycling intrazellulärer Komponenten und dient der Speicherung von Aminosäuren, Phosphaten, anorganischen Ionen und S-Adenosylmethionin (Jones, Webb et al. 1997). Dafür enthält sie ein umfassendes Repertoire an Proteasen, Lipasen und Hydrolasen wie zum Beispiel Proteinase A und B, Carboxypeptidase S und Y, Aminopeptidase I und Y,  $\alpha$ -Mannosidase, Trehalase und Alkalische Phosphatase (Wiemken, Schellenberg et al. 1979). Das Innere der Vakuole wird durch aktiven, vATPase-vermittelten Protonen-Eintransport auf den pH-Wert 6,2 gebracht, wohingegen das umgebende Cytosol einen pH-Wert von 6,8 besitzt (Preston, F. et al. 1989).

Verschiedene Sortierungswege führen zu einer biosynthetischen Proteine zur Vakuole, zum anderen werden aber auch lösliche und membrangebundene Proteine über die Vakuole abgebaut (Abb. 2-1).

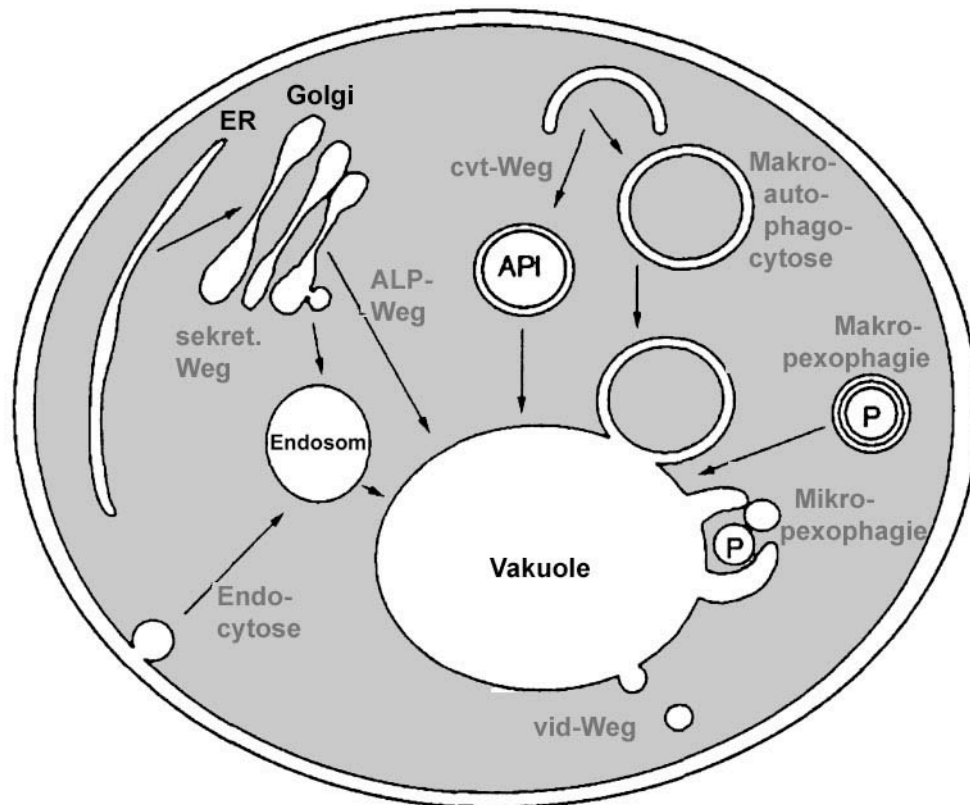


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der verschiedenen Vesikel-vermittelten Transportwege zur Hefevakuole.

Die endocytotischen und sekretorischen Wege transportieren Proteine über das Endosom zur Vakuole. Der biosynthetische Alkalische Phosphatase (ALP) Weg führt Proteine direkt vom Golgi-Komplex dorthin. Der „vacuolar import and degradation“ (vid) Weg und die Pexophagie dienen dazu, cytosolische Proteine und Peroxisomen (P) spezifisch vom Cytosol in die Vakuole zu bringen. Bei der Makroautophagocytose handelt es sich um einen unspezifischen Prozess, bei dem große Mengen Cytoplasma nach Eintransport ins Vakuolenlumen abgebaut werden. Der „cytoplasm-to-vacuole targeting“ (cvt) Weg vermittelt die spezifische Aufnahme der Hydrolase Aminopeptidase I (API) aus dem Cytosol ins Vakuolenlumen. Bei all diesen Transportvorgängen erfolgt ein Membranfluss hin zur Vakuole.

Abbildung nach (Scott and Klionsky 1998)

Zu den biosynthetischen Wegen gehört der vps-Weg, über den die meisten Proteine wie z.B. die Carboxypeptidase Y, vom Golgi über das prävakuoläre Kompartiment / Endosom zur Vakuole transportiert werden (vacuolar protein sorting, (Raymond, Howald-Stevenson et al. 1992), aus (Rothman and Stevens 1986; Rothman, Howald et al. 1989; Bankaitis, Johnson et al. 1986; Robinson, Klionsky et al. 1988)). Eine Abkürzung beschreibt die Alkalische Phosphatase, die mit Hilfe des AP3-Adaptors in Vesikeln direkt vom Golgi zur Vakuole gelangt (Cowles, Odorizzi et al. 1997) wie auch das vakuoläre t-SNARE Vam3p (Rehling, Darsow et al. 1999). Ein besonderer Fall ist die Aminopeptidase I, die im Cytosol synthetisiert wird, dort oligomerisiert und

eingeschlossen in die sogenannten Cvt-Vesikel ins Vakuolenlumen transportiert wird (cvt: cytoplasm-to-vacuole targeting; (Harding, Morano et al. 1995)). Die Größenzunahme des Organells kann durch Wachstum und Teilung der Zelle ausgeglichen werden (Ishikawa, Catlett et al. 2003).

Unter Hungerbedingungen erfolgt zusätzlich ein autophagischer Transport von Cytosol ins Vakuolenlumen, um Zellbausteine zu recyceln und die Zellen auf eine Hungerphase vorzubereiten (s. 2.3; 2.4). All diese Transportvorgänge werden durch membranumhüllte Vesikel vermittelt, die vor allem bei einem Wachstumsarrest durch Hungerbedingungen zu einer Vergrößerung der Vakuolenoberfläche führen.

## **2.3 Makroautophagocytose in *S.cerevisiae***

Bereits 1992 wurde die Anreicherung Autophagischer Körperchen bei Stickstoffmangel in den Vakuolen Proteinase-defizienter Hefestämme beschrieben (Takeshige, Baba et al. 1992; Baba, Takeshige et al. 1994). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden verschiedene genetische Screens durchgeführt nach Mutanten, die keine Autophagischen Körperchen mehr anreicherten (Apg-Screens (Autophagy): Tsukada and Ohsumi 1993; Noda, Matsuura et al. 1995; Aut-Screen (Autophagy): Thumm, Egner et al. 1994). Bei der Charakterisierung der dabei identifizierten Proteine stellte sich heraus, dass die meisten auch am biosynthetischen Transport von Aminopeptidase I aus dem Cytosol ins Vakuolenlumen beteiligt waren (cvt-Weg: cytoplasm to vacuole targeting; vgl. Abb. 2-2; Scott, Hefner-Gravink et al. 1996; Harding, Hefner-Gravink et al. 1996).

Nach Induktion der Makroautophagocytose durch Hungerbedingungen bilden sich im Cytosol die sogenannten Autophagosomen, Vesikel mit einem Durchmesser von 300-900 nm, die von zwei Membranen umgeben sind (Takeshige, Baba et al. 1992). Die Außenmembran enthält wenige Transmembranpartikel, in der inneren Membran sind elektronenmikroskopisch keine zu erkennen (Baba, Osumi et al. 1995). Autophagosomen sind im Cytosol selten zu sehen. Vermutlich fusionieren sie direkt nach ihrer Vollendung mit der Vakuole, wobei die äußere Membran mit der Vakuolenmembran verschmilzt und den inneren Vesikel ins Vakuolenlumen entlässt.

Einige der Proteinkomponenten, die für die Vollendung der Autophagosomen und cvt-Vesikel nötig sind, wurden ausführlich beschrieben (Mizushima, Yoshimori et al. 2003; Mizushima, Ohsumi et al. 2002; Khalfan and Klionsky 2002; Huang and Klionsky 2002). Dabei handelt es sich zum einen um das Apg12-Apg5-Konjugationssystem, zum anderen um das Aut7/Apg8-Lipidierungssystem, die beide ähnlich dem Ubiquitin-Konjugationssystem ablaufen. Das Protein Apg7 besitzt Homologie zu einem E1 Ubiquitin-aktivierenden Enzym. Es aktiviert das C-terminale Glycin von Apg12 durch ATP-Hydrolyse, indem es eine Thioesterbindung mit ihm eingeht (Mizushima, Noda et al. 1998). Apg12 wird danach auf Apg10 übertragen, das einem E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzym entspricht. Dieses vermittelt anschließend die kovalente Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der Carboxy-Gruppe von Apg12 und der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys149 in Apg5. In Hefe wechselwirkt Apg5 immer mit homo-oligomerisiertem Apg16, was zur Bildung eines 350 kDa-Komplexes führt. Der Großteil dieses Konjugats ist im Cytosol lokalisiert, nur ein kleiner Teil ist nahe der Vakuole in einer prä-autophagosomalen Struktur (PAS) zu finden, von der aus die Bildung der Hefe-Autophagosomen stattzufinden scheint (Kuma, Mizushima et al. 2002; Kim, Huang et al. 2002). Die Bildung dieses Konjugats ist essentiell für das Voranschreiten der Autophagocytose.

Das zweite beschriebene Konjugationssystem läuft nach einem ähnlichen Prinzip ab. Das C-terminale Arginin von Aut7/Apg8 wird durch Aut2/Apg4 abgespalten und Aut7/Apg8 wird über das freiwerdende Glycin durch Apg7 und Aut1/Apg3 auf Phosphatidylethanolamin übertragen (Ichimura, Kirisako et al. 2000). Aut7/Apg8 ist ein Membran-gebundenes Protein, das unter Hungerbedingungen verstärkt exprimiert wird. Zusätzlich findet eine Relokalisierung des Proteins von kleineren punktförmigen Strukturen im Cytosol hin zu größeren Vesikeln statt, die als Autophagosomen und Autophagische Körperchen identifiziert wurden. Aut7/Apg8 ist auf der inneren Membran der Autophagosomen und im Lumen der Autophagischen Körperchen zu finden (Kirisako, Baba et al. 1999).

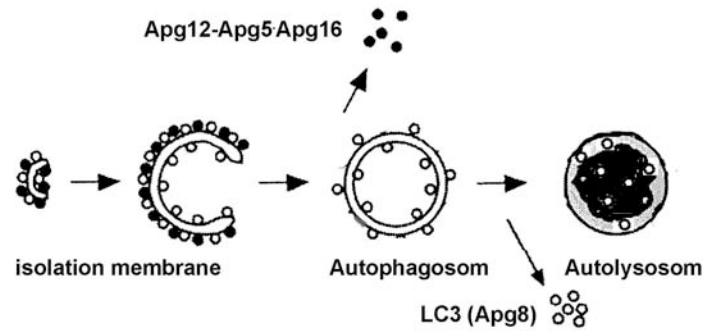


Abb.2-2: Modell der Autophagosomen-Bildung in Säugerzellen.

Das Apg12-Apg5-Konjugat und Apg16L sind auf der „isolation membrane“ lokalisiert, während sich diese ausdehnt. LC3 (Aut7/Apg8) wird zusätzlich zum sich bildenden Autophagosom rekrutiert und mit diesem abgebaut, während Apg12-Apg5 im Cytosol verbleiben.

Abbildung abgewandelt nach (Mizushima, Yoshimori et al. 2003).

Bei Untersuchungen an embryonalen Stammzellen, die GFP-Apg5 exprimierten, konnte gezeigt werden, dass sich die Vorstufen der Autophagosomen, die sogenannten „isolation membranes“, nach Hungerinduktion in der Nähe der ER-Cisternen bilden (Mizushima, Yamamoto et al. 2001). In  $APG5^{-/-}$ -Zellen sind diese Vorstufen nur sehr selten zu finden, Autophagosomen können nicht mehr nachgewiesen werden. Die zelluläre Konzentration an Apg12 und Apg5 ändert sich durch Hungerinduktion nicht, es findet jedoch eine Relokalisierung der Proteine zu den „isolation membranes“ statt, wie durch Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie mit GFP-Apg5 gezeigt wurde. Apg5 lokalisiert zur äußeren Membran dieser Vorstufen, während es auf Autophagosomen kaum mehr zu finden ist. In „time-lapse“-Experimenten konnte beobachtet werden, dass sich GFP-Apg5-gefärbte punktförmige Strukturen bilden, sich langsam linear ausdehnen und eine halbrunde Form annehmen, bevor die Fluoreszenz wieder verschwindet. Die Halbwertszeit dieser Strukturen betrug ca. 10 min. Das sich daraus ergebende Modell ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Die Relokalisierung von GFP-Apg5 konnte durch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitoren 3-Methyladenin und Wortmannin verhindert werden.

Die Hefe-Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Vps34 wurde in zwei verschiedenen Komplexen gefunden. Zusammen mit Vps15, Vps38 und mit Apg6/Vps30 ist sie essentiell für den biosynthetischen Transport zur Vakuole. In einem zweiten Komplex, in dem statt Vps38 Apg14 enthalten ist, spielt sie nur für die



Autophagocytose eine Rolle (Kihara, Noda et al. 2001). Der Komplex mit Apg14 zeigt verglichen mit dem Vps38-Komplex nur eine geringe PI3-Kinase-Aktivität.

Die Maschinerie zur Bildung der Autophagosomen benötigt also bestimmte Proteinkomponenten, die zum Teil während der Vesikelbildung durch Proteine oder Lipide modifiziert und nur während eines bestimmten Zeitabschnitts benötigt werden. Dieser Membranprozess ist hochspezifisch und ist zum einen durch Proteinsynthese (Apg8) zum anderen durch Proteinrelokalisierung (Apg5) reguliert.

## 2.4 Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae*

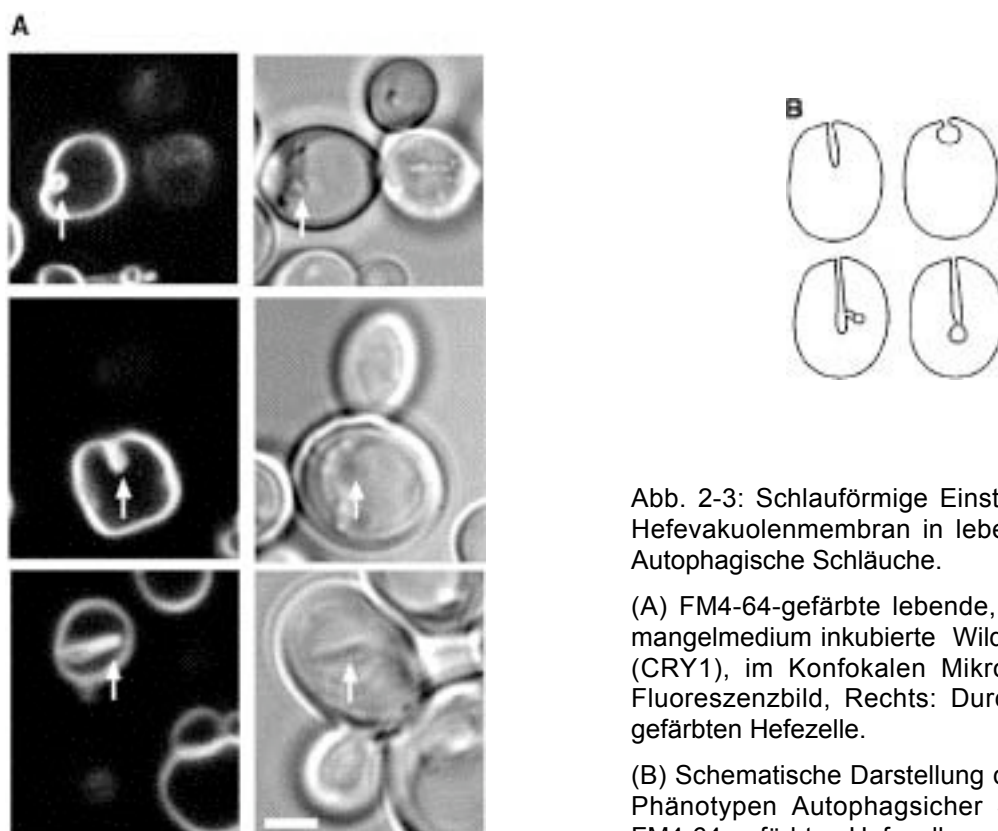


Abb. 2-3: Schlauförmige Einstülpungen der Hefevakuolenmembran in lebenden Zellen: Autophagische Schläuche.

(A) FM4-64-gefärbte lebende, in Stickstoffmangelmedium inkubierte Wildtyphefzellen (CRY1), im Konfokalen Mikroskop. Links: Fluoreszenzbild, Rechts: Durchlichtbild der gefärbten Hefezelle.

(B) Schematische Darstellung der möglichen Phänotypen Autophagischer Schläuche in FM4-64-gefärbten Hefezellen.

Abbildung aus: (Muller, Sattler et al. 2000)

Die Mikroautophagocytose wurde in Säugerzellen anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen beobachtet (Seglen and Bohley 1992), konnte aber noch nicht näher charakterisiert werden. 2000 wurde ein mikroautophagischer Abbauweg in *S.cerevisiae* beschrieben (Muller, Sattler et al. 2000). Durch *in vivo* Färbungen von Hefevakuolen mit dem Farbstoff FM4-64 konnten dynamische Vorgänge der Membran beobachtet werden, bei denen sich schlauchförmige Einstülpungen der Hefevakuole bildeten (Abb. 2-3). Auch in

elektronenmikroskopischen Aufnahmen gehungerter Hefen waren diese sogenannten Autophagischen Schläuche zu sehen. Die Häufigkeit von Zellen mit Autophagischen Schläuchen, die durch eine FM4-64-Färbung sichtbar gemacht wurden, war in Stickstoffmangelmedium höher als in Vollmedium. Makroautophagocytosemutanten wiesen eine reduzierte Anzahl an Autophagischen Schläuchen auf verglichen mit dem Wildtyp.

Durch Gefrierbruch-Experimente wurde die Morphologie der Autophagischen Schläuche untersucht. Am Übergang von der Vakuolenmembran zur Einstülpung sind die beiden Membranen noch nicht zu unterscheiden. Je weiter man entlang des Autophagischen Schlauchs ins Innere der Vakuole wandert, desto geringer wird die Dichte an Transmembranprotein-Komplexen. Es findet eine laterale Sortierung der Membrankomponenten statt, so dass die am Ende des Autophagischen Schlauchs abgeschnürten Vesikel keine im Elektronenmikroskop nachweisbaren Transmembranpartikel mehr tragen (Abb. 2-4).

Es war möglich, die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae in vitro* in einem zellfreien System zu untersuchen (Sattler and Mayer 2000). Dazu wurden isolierte Hefevakuolen mit ATP, Salzen, Cytosol und Luciferase als Substrat für die Aufnahme bei 27 °C inkubiert. Nach Reisolierung der Vakuolen wurde die aufgenommene Luciferase quantifiziert. Die Reaktion konnte durch Concanamycin A, FCCP und GTP $\gamma$ S inhibiert werden. Sie war unabhängig von essentiellen Komponenten für die homotypische Vakuolenfusion wie durch spezifische Blockierung dieser Proteine mit Antikörpern gezeigt wurde (Sec17p, Sec18p, Vam3p, Vam7p und Nyv1p). Bei Experimenten mit Cytosol verschiedener Autophagocytosemutanten konnte nur eine Reduktion der Luciferase-Aufnahme-Aktivität um 50 % beobachtet werden.

Bei kinetischen Untersuchungen der Mikroautophagocytose *in vitro* konnten verschiedene Inhibitoren charakterisiert werden, die eine frühe oder eine späte Hemmung der Mikroautophagocytose bewirkten (Kunz 2002). Zu den frühen Inhibitoren gehören GTP $\gamma$ S, Nystatin und Aristolochiasäure. Zu den späten Inhibitoren zählen FCCP in Kombination mit Valinomycin, Rapamycin und K252a.

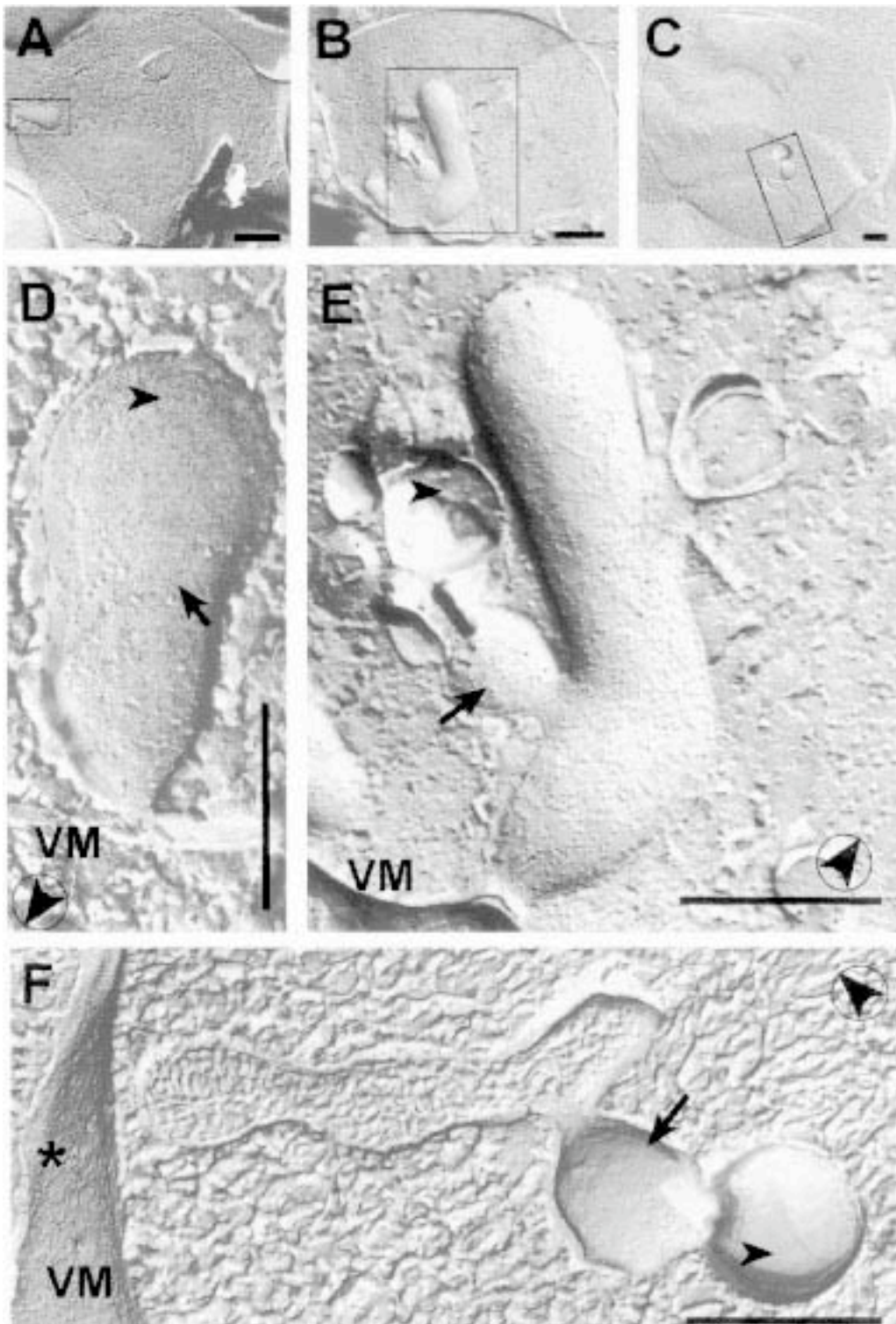


Abb. 2-4: Verteilung von Transmembrankomplexen entlang der Autophagischen Schläuche.

(A, B, und C) Drei Vakuolen eines Wildtyphefestammes (DBY5734) prozessiert für Gefrierbruch-Analyse. Die markierten Bereiche (Kästchen) sind in D, E, und F vergrößert dargestellt. Die höhere Dichte an Transmembranpartikeln an der Basis der Einstülpungen (Pfeile) und das Fehlen dieser Komplexe an den Spitzen (Pfeilspitzen) ist klar zu erkennen. VM: Vakuolenmembran. Länge der Balken: (A-C, E, F) 0,5  $\mu\text{m}$ ; (D) 0,25  $\mu\text{m}$ .

Abbildung aus: (Muller, Sattler et al. 2000)

## 2.5 Spezialfälle der Mikroautophagocytose

In verschiedenen Hefestämmen sind Sonderfälle der Mikroautophagocytose beschrieben, die sich durch den spezifischen Abbau eines Substrats nach einem Medienwechsel auszeichnen. Dabei handelt es sich zum einen um die „Piecemeal Microautophagy“ des Nukleus in *S.cerevisiae* und zum anderen um die vor allem in methylotrophen Hefen untersuchte Pexophagie.

Anfang diesen Jahres wurde für *S.cerevisiae* ein Spezialfall der Mikroautophagocytose beschrieben, die so genannte „Piecemeal Microautophagy of the Nucleus“ (Roberts, Moshitch-Moshkovitz et al. 2003). Durch elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen wurde die bereits früher etablierte Interaktion von Nvj1 und Vac8 (Pan, Roberts et al. 2000) näher untersucht. Unter Stressbedingungen wie Stickstoff- oder Glucose-Mangel erfolgt eine verstärkte Expression des zur Zellkernhülle lokalisierenden Nvj1. Durch die Fusion von Nvj1 mit EYFP konnte die Lokalisierung und der Abbau des Proteins beobachtet werden. Das Fusionsprotein ist an Membranbereichen auf dem Nukleus zu finden, die mit der Vakuolenmembran überlappen, wie durch FM4-64-Färbung der Vakuolenmembran sichtbar gemacht wurde. Es erfolgt eine Einstülpung der doppelt markierten Bereiche ins Lumen der Vakuole und eine Abschnürung der nukleäres Material enthaltenden Vesikel ins Innere der Vakuole hinein. In einer Deletionsmutante für das vakuoläre Membranprotein Vac8 ist keine Colokalisierung von Nvj1 mit der Vakuolenmembran zu beobachten. Außerdem ist Nvj1 gleichmässig über die Oberfläche des Nukleus verteilt, wohingegen es im Wildtyp nur in den mit der Vakuole überlappenden Bereichen zu finden ist. In Abhängigkeit von der vakuolären Protease Pep4 wird Nvj1 bei Stickstoffmangel abgebaut. In  $\Delta$ vac8-Zellen ist hingegen nur etwa 15 % Abbauprodukte zu beobachten. Die spezifische Nvj1-Degradation erfolgt unabhängig von dem Makroautophagocytose-Protein Apg7. Die Kernmembran, die in die Vakuole eingestülpt wird, scheint frei von Kernporen-Komplexen zu sein, wie anhand serieller Ultradünnschnitte durch Elektronenmikroskopie gezeigt wurde.

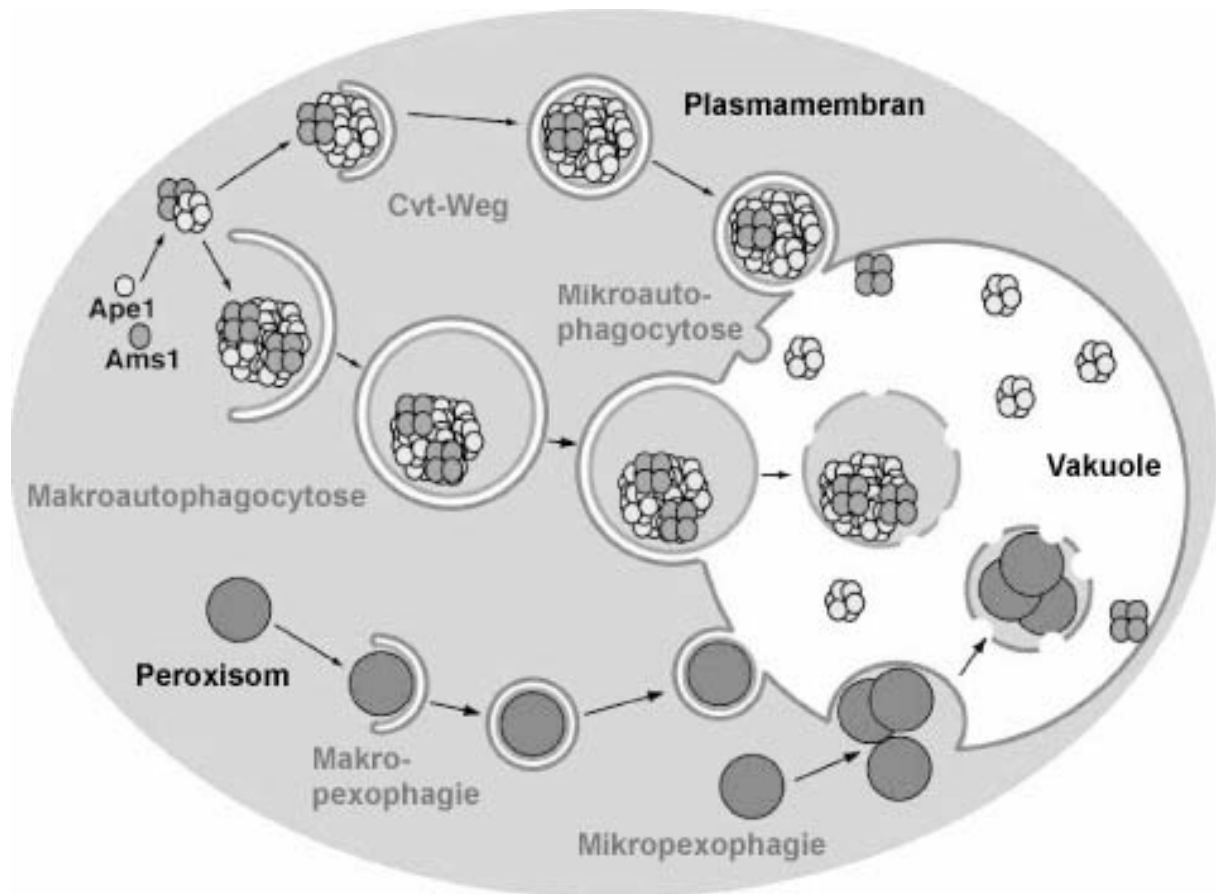


Abb. 2-5: Morphologie der Autophagocytose-, Pexophagie- und Cvt-Wege in Hefe.

Während der Makroautophagocytose, Makropexophagie und dem Cvt-Weg bilden sich von einer Doppelmembran umhüllte Vesikel im Cytosol, die unspezifisch Cytoplasma, Peroxisomen oder Pro-Ape1p und Ams1p einschließen. Nach der Vollendung der Vesikel werden diese zur Vakuole transportiert und fusionieren mit ihr, wodurch der von einer Membran umgebene Vesikel ins Innere der Vakuole gelangt und dort abgebaut wird. Dies erlaubt die Reifung der Pro-Ape1 oder das Recycling von Cytoplasma bzw. Peroxisomen. Bei Mikroautophagocytose und Mikropexophagie werden Cytoplasma oder Peroxisomen direkt über die Vakuolenoberfläche durch eine Einstülpung aufgenommen.

Abbildung nach (Stromhaug and Klionsky 2001)

Einen vor allem in den methylotrophen Hefen *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha* gut charakterisierten Spezialfall der Mikroautophagocytose stellt die sogenannte Pexophagie dar (Bellu and Kiel 2003; Kim and Klionsky 2000; Scott and Klionsky 1998). Methylotrophe Hefen sind in der Lage, durch Synthese einer Vielzahl von Peroxisomen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wie Fettsäuren oder Methanol zu wachsen. Nach einem Medienwechsel z. B. von der Kohlenstoffquelle Methanol zu Glucose erfolgt ein gezielter Eintransport und Abbau von Peroxisomen in der Vakuole. Die Synthese und der gezielte, vollständige Abbau der Peroxisomen sind also in Abhängigkeit von der Nahrungsquelle streng reguliert. In *P.pastoris* kann zwischen den Phänomenen Mikro- und Makropexophagie unterschieden werden

(schematisch dargestellt in Abb. 2-5). Ein Medienwechsel von der Kohlenstoffquelle Methanol zu Ethanol induziert Makropexophagie. Dabei werden die Peroxisomen nach und nach von mehreren Membranschichten umgeben, die anschließend mit der Vakuolenmembran fusionieren und die Organellen ihrem Abbau zuführen (Tuttle and Dunn 1995). Im Gegensatz dazu ist bei einem Umsetzen von Methanol zu Glucose zu beobachten, wie Cluster von Peroxisomen von fingerähnlichen Ausstülpungen der Vakuolenmembran umgeben werden, was ebenfalls zur Aufnahme ins Vakuolenlumen führt (Tuttle, Lewin et al. 1993). Durch Einsatz niedermolekularer Inhibitoren konnten Unterschiede zwischen den beiden Abbauwegen beschrieben werden. Für Mikropexophagie ist Proteinneusynthese notwendig, während der Einsatz des Inhibitors Cycloheximid auf die Makropexophagie keinen Einfluss hat (Tuttle and Dunn 1995).

Durch Einsatz eines GFP-Proteins mit einem Peroxisomenlokalisierungssignal in Kombination mit einer FM4-64-Färbung konnten Mikro- und Makropexophagie fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Der Proteaseinhibitor PMSF hatte keinen Einfluss auf den Peroxisomeneintransport durch Makropexophagie, behinderte jedoch die Einstülpung der Peroxisomen durch Mikropexophagie. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin hatte in einem frühen Stadium ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Mikropexophagie (verhinderte die Bildung komplexer Membranstrukturen, (Sakai, Koller et al. 1998)).

Bei einem Medienwechsel von verschiedenen Kohlenstoffquellen zu Glucose wurde auch in *S.cerevisiae* ein mikropexophagischer Prozess beobachtet (Chiang, Schekman et al. 1996). Nicht nur Organellen werden in die Vakuole transportiert, sondern auch bestimmte langlebige cytosolische Enzyme wie die Fructose-Bisphosphatase.

Durch verschiedene Screens nach Pexophagie-Mutanten in methylotrophen Hefen konnten Proteine identifiziert werden, die zum Teil nur für die Mikropexophagie (*PpGsa1,2*, *PpGsa9* = *ScCvt9*, *PpPag1,2,3*, *PpPdg1*) oder für Mikro- und Makropexophagie (*PpVps15*, *PpPdg2*, *PpPdg3*, *PpPag4,5,6*) essentiell waren. Einige dieser Proteine erwiesen sich auch als essentiell für die Makroautophagocytose (*HpPdd1*, *HpPdd7*, *PpGsa7* = *ScApg7* = *ScCvt2*, *ScAut7* = *ScApg8* = *ScCvt5*; Vergleich: Bellu and Kiel 2003). Bei *H.polymorpha* ist nur Makropexophagie zu

beobachten. Durch Deletion des Pdd1-Genes (homolog zu ScVps34) wird ein früherer Schritt bei der Makropexophagie verhindert. Bei Untersuchung der Pexophagie in *S.cerevisiae* wurde festgestellt, dass alle untersuchten Autophagocytose-Mutanten auch einen Defekt in der Pexophagie und im Apl-Eintransport in die Vakuole (cvt) aufwiesen (Hutchins, Veenhuis et al. 1999), was auf eine mechanistische Überlappung dieser Transportwege hindeutet.

## 2.6 Zielsetzung

Die Mikroautophagocytose in *Saccharomyces cerevisiae* stellt einen besonderen Prozess dar, bei dem eine direkte Abschnürung von Vesikeln ins Lumen eines Organells stattfindet. Bislang sind weder Bestandteile eines Protein-„Coats“, die diese besondere Deformation der Membran bewerkstelligen könnten, noch spezifische Substrate für diesen Abbauweg bekannt. Als Bestimmungsort verschiedener Vesikel-vermittelter Transportwege kommt es zu einer Zunahme der Vakuolenoberfläche, die unter Nahrungsmangelbedingungen nicht mehr durch Wachstum und Teilung der Zellen kompensiert werden kann. Dient die Mikroautophagocytose „nur“ dem Abbau von überschüssigen Lipiden? Um zu verhindern, dass die vakuolären Proteasen mit dem Cytosol der Zelle in Kontakt kommen, ist eine strenge Kontrolle der Protease-Aktivitäten nötig. Doch wie kann die Zelle kontrollieren, dass nur die Vesikel im Vakuolenlumen und nicht die umgebende Vakuolenmembran abgebaut werden?

Ziel dieser Arbeit war es, durch Anwendung verschiedener experimenteller Vorgehensweisen weitere Komponenten zu finden, die direkt oder indirekt an der Mikroautophagocytose beteiligt sind, und dies *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Mikroskopische Mikroautophagocytose-Screens

Der Farbstoff FM4-64 lagert sich spontan in die Cytoplasmamembran von Hefezellen ein und wird durch endocytotischen Vesikeltransport in die Zelle aufgenommen. Über frühe und späte Endosomen, sowie das prävakuoläre Kompartiment, auch Multivesicular body genannt, gelangt der Farbstoff in die Membran der Hefevakuole und reichert sich dort an. Bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 450-490 nm fluoresziert er rot (Vida and Emr 1995). Mit Hilfe dieses Farbstoffes wurde die Bildung von Autophagischen Schläuchen als Einstülpungen der Hefevakuole in *S.cerevisiae* beschrieben (Muller, Sattler et al. 2000; Sattler and Mayer 2000).

Durch mikroskopische Untersuchungen mit Hilfe einer FM4-64-Färbung sollten Hefe-Deletionsmutanten auf das Fehlen Autophagischer Schläuche hin untersucht werden. Bei Euroscarf, Frankfurt sind haploide Hefedeletionsmutanten in den Stammhintergründen BY4742 und BMA64-1A käuflich erhältlich. BY4742 hat mehrere kleine Vakuolen, während BMA64-1A größere Vakuolen besitzt (Abb.3-1). Die Bildung von Autophagischen Schläuchen kann in Hefezellen mit einer großen Vakuole leichter beobachtet werden, daher wurden alle erhältlichen haploiden Deletionsmutanten im BMA64-Hintergrund untersucht (119 Mutanten, s. Liste 1 im Anhang). Die Zellen wurden über Nacht in Vollmedium kultiviert und anschließend für 60 min in Stickstoffmangelmedium mit FM4-64 gefärbt, bevor sie weitere 120 min gehungert wurden. Die Hefestämme wurden mehrfach gefärbt und unter dem Mikroskop nach Autophagocytotischen Schläuchen untersucht. Leider unterschieden sich die Vakuolenstrukturen auch bei gleicher Behandlung der Zellen innerhalb einer Kultur so stark, dass nur bei 50 % der Hefestämme Schläuche gefunden werden konnten, während bei der anderen Hälfte keine endgültige Aussage möglich war.



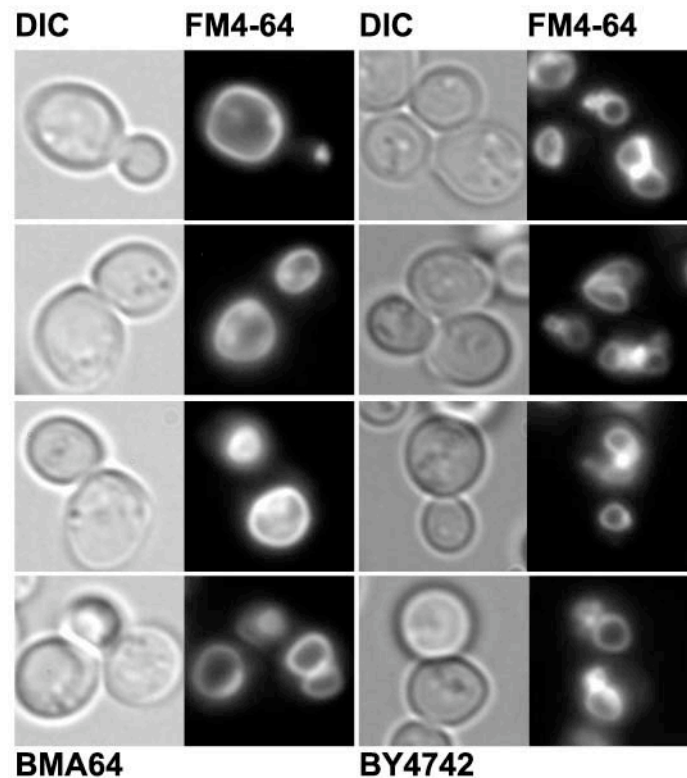


Abb. 3-1: FM4-64-Färbung der Wildtypstämme BMA64 und BY4742 nach 3 h in Stickstoffmangelmedium. Die Umrisse der Vakuolen sind durch den Farbstoff markiert und können im Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden (FM4-64).

Ein weiterer Ansatz war das gezielte Mikroskopieren bestimmter Deletionsmutanten mit bekanntem Vakuolenphänotyp. Durch eine Einstülpung der Vakuolenmembran und durch Abschnürung von Vesikeln ins Lumen hat die Hefezelle die Möglichkeit, überschüssiges Membranmaterial abzubauen. Deshalb ist ein möglicher Phänotyp für einen Defekt in der Mikroautophagocytose eine vergrößerte Vakuole.

Im Labor von William Wickner, Dartmouth Medical School, Hanover, USA wurde ein mikroskopischer Screen aller haploiden Deletionsmutanten im Stammhintergrund BY4742 durchgeführt. Dabei wurden Größe, Zahl und Aussehen der Vakuolen beurteilt. Freundlicherweise wurde mir die Liste der Mutanten mit vergrößerten Vakuolen zur Verfügung gestellt, um sie auf die Frequenz der Bildung Autophagocytotischer Schläuche nachzuscreenen (32 Hefestämme, s. Liste 2 im Anhang und Tabelle 3-1). Die Hefen einer logarithmisch wachsenden Übernachtskultur wurden in Stickstoffmangelmedium für 60 min mit FM4-64 gefärbt und danach für weitere zwei Stunden unter Stickstoffmangel inkubiert. Es wurden je 2 mal 200 Zellen daraufhin untersucht, ob sie 1-2 deutlich erkennbare Vakuolen

aufwiesen und ob darin Schläuche zu finden waren. Schon für den Wildtyp war die Frequenz an gut erkennbaren Schläuchen gering und unterschied sich von Experiment zu Experiment, was die Beurteilung der Mutanten erschwerte. Die untersuchten Deletionsmutanten sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Die meisten Stämme besaßen einen höheren Anteil an einzelnen großen Vakuolen (s. Tabelle 3-1 Spalte 3: Vergr.Vak. [%]). Der Anteil an Zellen mit 1-2 größeren Vakuolen pro Zelle wurde auf die Gesamtzahl im Wildtyp bezogen, wobei der Anteil im Wildtyp als 100 % gesetzt wurde. Außerdem wurde mikroskopisch die Anzahl an Autophagocytotischen Einstülpungen bestimmt. Die Zahl der Schläuche wurde auf die Zahl der Zellen mit größeren Vakuolen bezogen und in Prozent angegeben (Tabelle 3-1 Spalte 4: Aut. Schl.). Zum Beispiel wiesen die  $\Delta$ stp22- und die  $\Delta$ vps8-Mutanten vergrößerte Vakuolen und eine geringe Anzahl an Autophagischen Einstülpungen auf. Bei der Beurteilung der mikroskopischen Daten muss allerdings bedacht werden, dass nur eine Subpopulation der Zellen – die Zellen mit einzelnen großen Vakuolen - zur Beurteilung des Vorhandenseins Autophagischer Schläuche herangezogen werden kann. Dieses mikroskopische Verfahren ermöglicht vor allem die Detektion größerer Autophagischer Einstülpungen, während die Bildung kleinerer Autophagischer Schläuche nicht erfasst werden kann. Ein Teil der Mutanten wurde durch *in vivo*-pH-Messungen und Einsatz der isolierten Vakuolen in einem *in vitro*-Protonenpump- und Luciferase-Aufnahme-Assay näher charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Tests sind ebenfalls in Tabelle 3-1 aufgeführt und in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

Die *in vivo* CFDA-Färbung diente dazu, die vakuoläre Protonenpumpleistung der Hefemutanten abzuschätzen. Der Farbstoff diffundiert in die Hefezellen und wird im Vakuolenlumen durch unspezifische Esterasen zu einem Fluoresceinderivat gespalten, das in Abhängigkeit vom pH-Wert seiner Umgebung ein verändertes Fluoreszenzspektrum aufweist. Die Differenz der Emissionen zwischen der Anregung bei 458 und 488 nm ist bei einer nicht-pumpenden Hefemutante deutlich größer als beim. WT. Das Ergebnis für die Wildtypzellen wird in Abhängigkeit vom Ergebnis der  $\Delta$ vma11-Mutante als 100 % angegeben (Tabelle 3-1, Spalte 5: *in vivo* CFDA-Signal). Die  $\Delta$ vps8- und die  $\Delta$ ccr4-Mutanten zeigten zum Beispiel ein reduziertes Signal.

Tabelle 3-1: Charakterisierung der vakuolären Eigenschaften von Hefedeletionsmutanten (BY4742).

Nr.	Deletion	Vergr.Vak. [%]	Aut.Schl. [%]	<i>In vivo</i> CFDA-Signal [%]	<i>In vitro</i> vak. H <sup>+</sup> - Pumpen	<i>In vitro</i> Luciferase Aufnahme
48	WT	100	38	100	100	100
339	Δfun12	179	12			
340	Δswj1	84	24			94
341	Δder1	181	30			84
342	Δhis7	146	28			
343	Δstp22	316	1	97	87	13
344	Δend6	317	13			
345	ΔYDR140w	183	27			
346	Δvid21	161	30			
347	ΔYHR021c	111	28			152
348	Δmrt4	173	15			157
349	Δvid31	321	25	98		107
350	Δrem50	138	35			
351	Δvma11			0	22	3
352	Δprm4	203	23			
476	Δvps8	186	9	42	140	44
477	Δccr4	203	22	58	171	133
478	Δcln3	113	32	122		
479	Δies6	179	33	127		
481	Δbub1	110	27	117		
482	Δbud32	153	28	153		
483	Δlas21	149	28	70		
484	Δbck1	134	45	98		
486	Δbdf1	109	39	82		
487	Δtus1	57	48	68		
488	Δplc2	125	22	125	67	214
489	ΔYMR032w	42	22	66	101	120
490	ΔYNL054w	148	32	99	120	165
491	Δarp5	166	26	88	111	46
492	Δtof1	116	33	91		
493	Δmck1	90	46	81		
494	Δpex6	117	28	97		
495	ΔYOR129c	143	31	98		
496	ΔYOR359w	42	19	114	95	63
497	ΔIbh13	148	31	111		

Vergr.Vak.: Anteil der Zellen, die in einer FM4-64-Färbung ein oder zwei größere Vakuolen zeigten - im Vergleich zum WT (100 % entsprachen 30 Zellen mit einzelnen größeren Vakuolen bei 100 ausgezählten Zellen; 5.2.4).

Aut.Schl.: Anzahl der gezählten Autophagischen Schläuche in einer FM4-64-Färbung bezogen auf die Zahl der vergrößerten Vakuolen - im Vergleich zum Wildtypanteil (38 %; 5.2.4).

*In vivo* CFDA-Signal: Bestimmung der Vakuolenansäuerung anhand der FDA-Fluoreszenz. Das Signal des Wildtyps wurde als 100 % gewertet, das der Δvma11-Mutante als 0 %. Die Ergebnisse der Mutanten wurden auf diese Differenz bezogen (5.2.6).

*In vitro* vak. H<sup>+</sup>-Pumpen: Die isolierten Vakuolen wurden im Protonenpump-Assay eingesetzt. Die Pumpleistung des Wildtyps wurde als 100 % gesetzt, die Signaländerung der  $\Delta$ vma11-Vakuolen als 0 % (5.2.9).

*In vitro* Luciferase Aufnahme: Die isolierten Vakuolen wurden im Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt. Die Luciferase-Aufnahme des Wildtyps wurde als 100 % gewertet (5.2.10).

Um die Eigenschaften der Vakuolen bestimmter Mutanten genauer zu charakterisieren, wurde der *in vitro* Protonenpump-Assay angewandt. Dazu wurden isolierte Vakuolen mit BCECF-Dextran inkubiert. BCECF ist ebenfalls ein Fluorescein-Derivat, das in Abhängigkeit vom pH-Wert seiner Umgebung sein Fluoreszenz-Spektrum verändert. Durch die aktive Protonenaufnahme ins Vakuolenlumen wird die Umgebung alkalisiert und eine Änderung des Fluoreszenzsignals kann detektiert werden. Ein Signalanstieg entsprechend dem Wildtyp wurde als positiv für die Protonenaufnahme bewertet, ein geringerer Signalanstieg, wie bei Vakuolen des  $\Delta$ vma11-Stammes, wurde als negativ definiert (Tabelle 3-1, Spalte 6: *in vitro* vak. H<sup>+</sup>-Pumpen). Alle untersuchten Mutanten waren in der Lage, Protonen aktiv aufzunehmen.

Zusätzlich wurde die Mikroautophagocytose *in vitro* untersucht. Die isolierten Vakuolen wurden im Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt (Tabelle 3-1, Spalte 7: *in vitro* Luciferase Aufnahme). Die Mutante  $\Delta$ stp22 war inaktiv (vergleiche auch 3.2.1), während  $\Delta$ vps8 und  $\Delta$ arp5 eine reduzierte Aufnahme zeigten.

Es stellte sich heraus, dass nur die Hefe-Mutanten, die bereits in Screens nach „vacuolar protein sorting“-Defekten (stp22 = vps23 und vps8) identifiziert worden waren, den Anforderungen für Mikroautophagocytose-Mutanten genügten. Die  $\Delta$ stp22-Mutante zeigte eine geringe Anzahl an Autophagocytotischen Schläuchen und ihre Vakuolen nahmen *in vitro* keine Luciferase auf, während eine Hauptfunktion der Vakuole, die Aufrechterhaltung des Protonengradienten durch Protonenaufnahme *in vivo* und *in vitro* funktionell war (genauer s. 3.2.1). Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm  $\Delta$ vps8 keinen eindeutigen Phänotyp, da er zwar eine reduzierte Anzahl an Schläuchen hatte, *in vivo* aber ein geringeres CFDA-Signal aufwies und die Vakuolen noch zu 50 % Luciferase-Aufnahme fähig waren. Es wird davon ausgegangen, dass die reduzierte Luciferase-Aufnahme in diesem Fall nur ein Sekundäreffekt des Vakuolenphänotyps ist. Auch Arp5 stellt keinen geeigneten Kandidaten für ein an der Mikroautophagocytose beteiligtes Protein dar, da der

Deletiosstamm Autophagische Schläuche aufwies und seine Vakuolen Luciferase aufnahmen. Außerdem lokalisiert das Protein überwiegend im Nukleus (Grava, Dumoulin et al. 2000).

## 3.2 Mikroautophagocytose *in vitro*: Luciferase-Aufnahme

Um die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae in vitro* zu untersuchen, wurde die Aufnahme des Reporterenzym Luciferase in isolierte Hefevakuolen aus verschiedenen Deletionsmutanten getestet.

Dazu wurden Hefestämme im Stammhintergrund BY4742 eingesetzt. Die Verdopplungszeiten der Deletionsmutanten in Vollmedium variierten stark. Der WT besaß im logarithmischen Wachstum bei 30 °C eine Verdopplungszeit von 80 min. Die Deletion von *VAM7* oder *FAB1* verlängerte die Verdopplungszeiten auf 86 und 95 min, während die Hefen ohne die „class E“-Endocytose-Proteine Stp22 und Vps4 oder ohne das Proteolipid Vma11 sogar 105 min für ihre Verdopplung benötigten. Die Deletion der Phosphatidylinositol-3-Kinase Vps34 führte zu einem extrem verlangsamten Wachstum mit einer Verdopplungszeit von 5,5 Stunden. Daraus wird ersichtlich, dass der Verlust dieses Proteins die Hefezellen schwer beeinträchtigte. Sie wiesen einen Hitze- und Kälte-sensitiven Phänotyp auf, so dass sie bei Raumtemperatur angezogen und auch bei 20 °C aufbewahrt werden mussten. Nur die Kultur für die Vakuolenpräparation wurde für 15 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Durch Zusatz des vATPase-Inhibitors Concanamycin A in einer Konzentration von 0,1 µM kann die *in vitro*-Luciferase-Aufnahme durch Wildtypvakuolen stark reduziert werden. Diese Hemmung wurde als Negativ-Kontrolle für die aktive mikroautophagische Luciferase-Aufnahme eingesetzt. Als weitere Negativ-Kontrolle für die Luciferase-Aufnahme in isolierte Vakuolen wurden die Vakuolen der *vma11*-Deletionsmutante verwendet.

### 3.2.1 □stp22-Vakuolen

Einige der in 3-1 untersuchten Hefedeletionsmutanten wurden für den *in vitro* Mikroautophagocytose-Assay eingesetzt. Dabei war vor allem die □stp22-Mutante von Interesse, da sie vergrößerte Vakuolen, aber keine Autophagischen Schläuche besitzt (s. Tabelle 3-1: Vergr.Vak und Aut.Schl; Abb. 3-2a). Das Protein Stp22 trägt

auch den Namen Vps23, da es bei einem Screen für „Vacuolar Protein Sorting“ gefunden wurde. Deshalb wurde *in vivo* und *in vitro* die Protonenpumpleistung der Vakuolen als Qualitätskontrolle für vakuoläre Grundfunktionen untersucht. Die Zellen zeigten in Bezug auf die *in vivo*-CFDA-Färbung einen Wildtyp-Phänotyp (s. Tabelle 3-1: CFDA-Signal 97 %).

Die isolierten Vakuolen wurden in einem Pump-Assay mit BCECF-Dextran als Nachweisreagens eingesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff zeigt die Alkalisierung des Mediums an, die durch die aktive Protonenaufnahme der isolierten Vakuolen verursacht wird. Wie in Abbildung 3-2b zu sehen ist, nahmen sowohl der Wildtyp BY4742 als auch die  $\Delta$ stp22-Vakuolen Protonen auf. Diese aktive Aufnahme wurde durch ATP-Zugabe gestartet und konnte durch 0,1  $\mu$ M Concanamycin A auf circa die Hälfte reduziert werden. Die  $\Delta$ vma11-Vakuolen zeigten einen Anstieg der BCECF-Fluoreszenz von ca. 10 % des Kontrollwerts.

Die isolierten Vakuolen wurden auch im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt (Abb. 3-2c). Die Luciferase-Aufnahme der Wildtypvakuolen (100 %) konnte durch Zusatz von 0,1  $\mu$ M Concanamycin A auf 5,2 % reduziert werden. Die Vakuolen der stp22-Deletionsmutante zeigten eine Aktivität von 13 % des Wildtyp-Signals, die durch Zusatz von Concanamycin A nicht reduziert wurde. Es handelte sich bei diesem Signal also nicht um eine aktive Aufnahme der Luciferase, da diese sonst durch Concanamycin A reduziert werden müsste. Die  $\Delta$ vma11-Vakuolen zeigten keine Aktivität (1 %). Bei einer Analyse der Proteine in isolierten  $\Delta$ stp22-Vakuolen wurde ein geringerer Gehalt an vakuolären Markerproteinen festgestellt (ALP ca. 50 %, CPY 80 %, Vam3 10 % im Vergleich zum Wildtyp, nicht gezeigt).

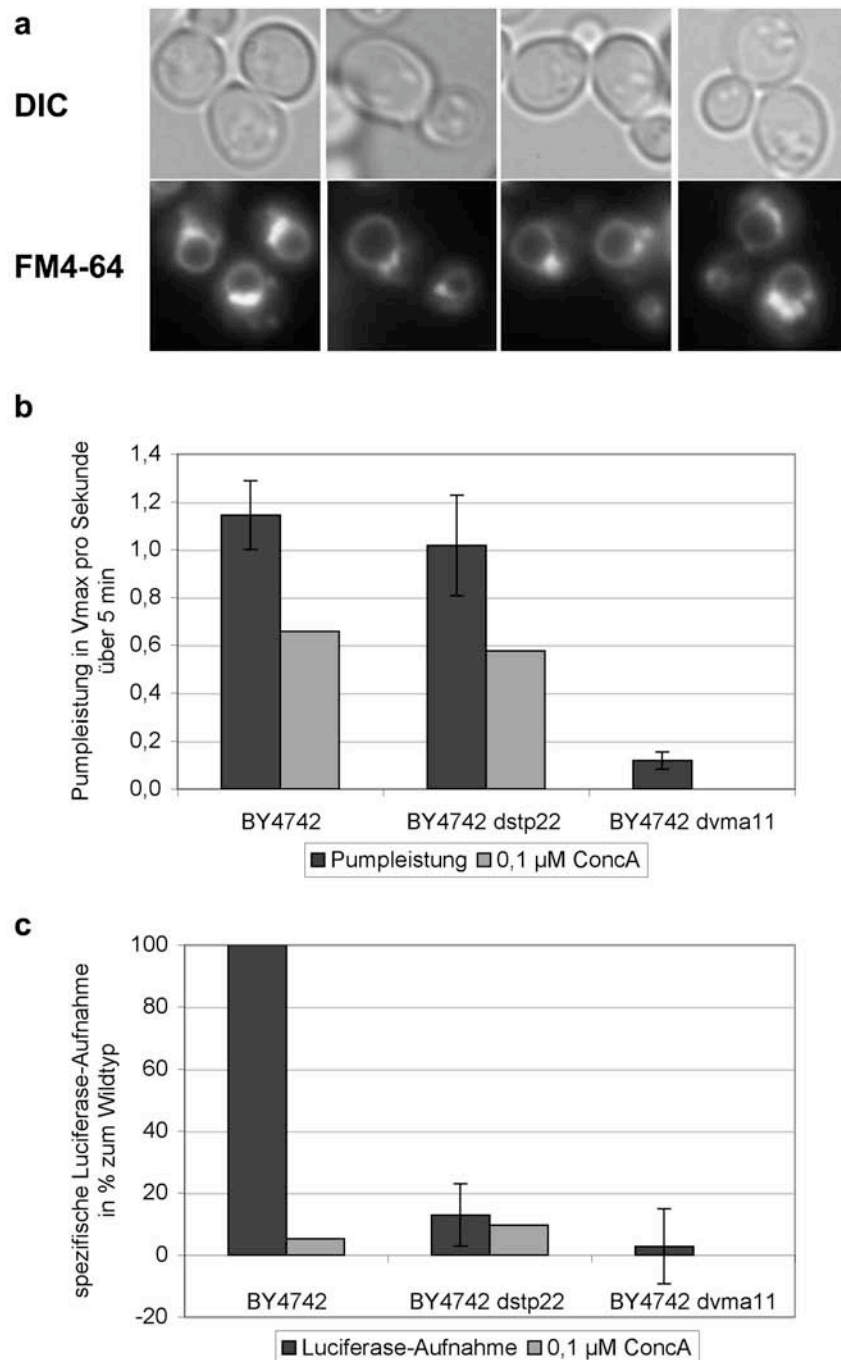


Abb. 3-2: BY4742  $\Delta$ stp22 (a) FM4-64-Färbung nach 3 h in Stickstoffmangelmedium. Der class E-Phänotyp ist an den stark leuchtenden Bereichen am Vakuolenrand und der schwächeren Färbung der Vakuolenoberfläche zu erkennen. (b) Einsatz der isolierten Vakuolen im Protonen-Pump-Assay mit BCECF-Dextran. BY4742- und  $\Delta$ stp22-Vakuolen wiesen eine Protonenpumpleistung auf, die durch Zusatz von 0,1  $\mu$ M Concanamycin A auf etwa 50 % reduziert werden konnte. Die  $\Delta$ vma11-Vakuolen nahmen keine Protonen auf (5.2.9). (c) Einsatz der isolierten Vakuolen im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay. Nur der Wildtyp BY4742 nahm Luciferase auf, diese Aufnahme konnte durch Zusatz von 0,1  $\mu$ M Concanamycin A verhindert werden (5.2.10).

### 3.2.2 $\Delta$ fab1- und $\Delta$ vps34-Vakuolen

Zwei Proteine, die eine wichtige Rolle für die Funktionalität der Hefevakuole spielen sind die Kinasen Fab1 und Vps34 (Herman and Emr 1990; Yamamoto, DeWald et al. 1995; Odorizzi, Babst et al. 2000; Simonsen, Wurmser et al. 2001). Sie sind am Lipidstoffwechsel beteiligt und lokalisieren zum Prävakuolären Kompartiment und zur Vakuolenmembran. Vps34 ist die einzige Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase in Hefe. Das Produkt dieser Phosphorylierungsreaktion (Phosphatidylinositol-3-Phosphat: PI3P) wird durch Fab1, eine Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-5-Kinase weiter modifiziert. In etwa 50 % der  $\Delta$ vps34-Zellen ist im Durchlicht eine große Vakuole zu erkennen, die übrigen Zellen sind mit Vesikeln unterschiedlicher Größe ausgefüllt. Da diese Zellen einen schweren Endocytose-Defekt haben, war erst nach einer mehrstündigen Färbung eine FM4-64-Fluoreszenz der Vakuolenmembran zu erkennen (Abb. 3-3a). Die  $\Delta$ fab1-Zellen besaßen eine große Vakuole, die fast das ganze Zell-Lumen ausfüllte (Abb. 3-3a).

Eine mögliche Erklärung für den Phänotyp der vergrößerten Vakuole ist ein Defekt in der Mikroautophagocytose, der die Umsetzung überschüssiger Vakuolenmembran verhindert. Aus diesem Grund wurden die Mutanten ausgewählt, um sie *in vitro* auf einen Defekt in der Mikroautophagocytose zu untersuchen.

Bei der *in vivo*-pH-Messung mit CFDA stellte sich heraus, dass die  $\Delta$ vps34-Zellen nur etwa 60 % des Wildtyp-Signals lieferten. Diese reduzierte Ansäuerung des Vakuolenlumens ist aber nicht limitierend für die Autophagocytose, da die Zellen anderer Deletionsmutanten mit einem ähnlichen Signal im Luciferase-Aufnahme-Assay Wildtyp-Aktivität zeigten (vgl. Tabelle 3-1). In den isolierten  $\Delta$ vps34-Vakuolen waren durch Western Blot-Analysen nur geringe Mengen an CPY und ALP, zwei Vakuolenmarkern, nachzuweisen (CPY ca. 10 %, ALP ca. 15 %, nicht gezeigt). Diese Vakuolen zeigten im Luciferase-Aufnahme-Assay eine ähnlich geringe Aktivität wie die Vakuolen der Negativkontrolle  $\Delta$ vma11 (Abb. 3-3b). Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zugabe des Lipids PI3P zur *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Reaktion einen Einfluss auf die Aktivitäten der Vakuolen haben könnte. Bis zu einer Konzentration von 0,1 mM bewirkte das Lipid keine Änderung der Aktivitäten – weder in Wildtyp noch in  $\Delta$ vps34-Vakuolen (nicht gezeigt).



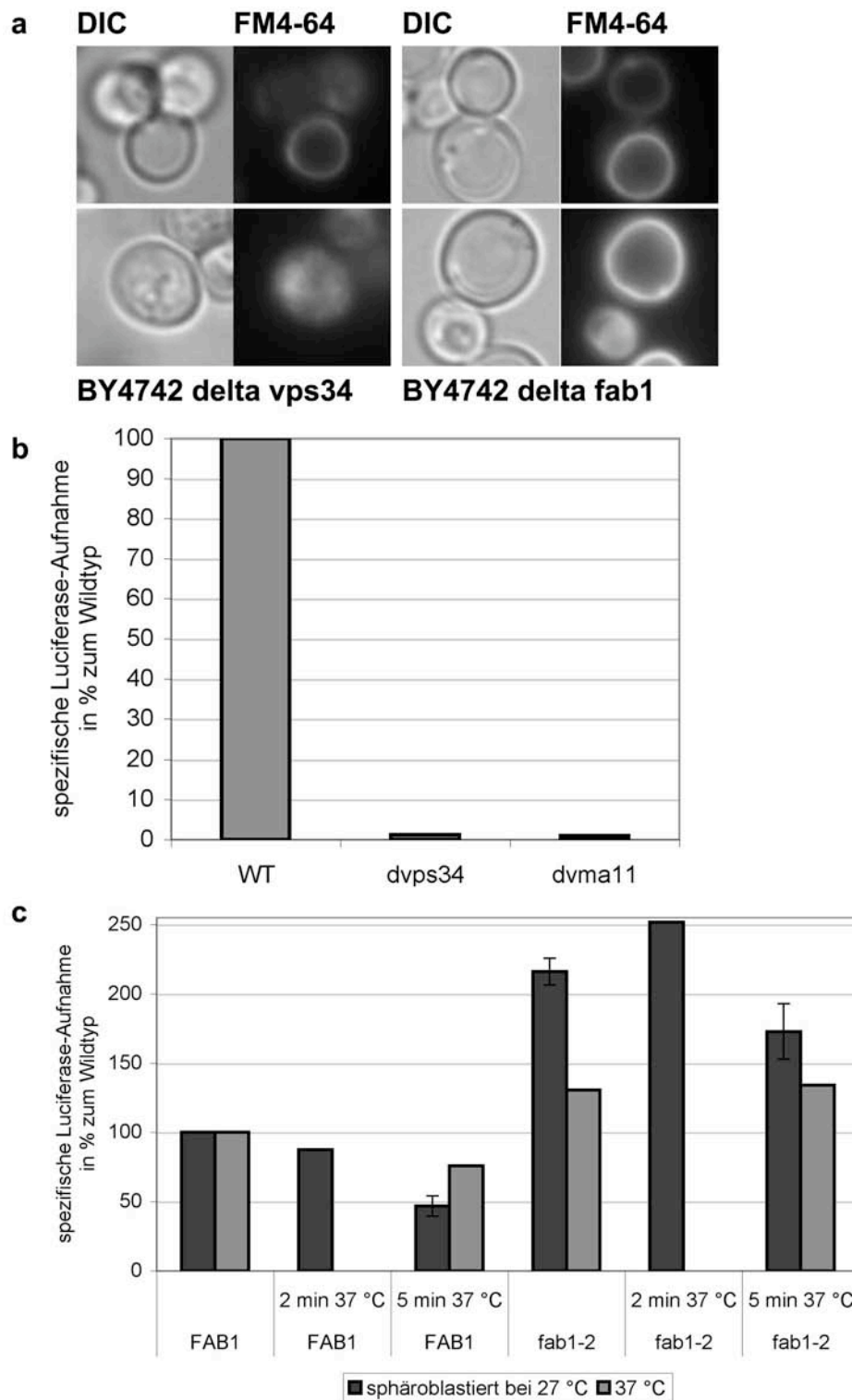


Abb. 3-3: BY4742  $\Delta$ vps34,  $\Delta$ fab1, sowie FAB1 und fab1-2.

(a) FM4-64-Färbung nach 5 h beziehungsweise 3 h in Stickstoffmangelmedium. Der  $\Delta$ vps34-Stamm besaß entweder eine einzelne Vakuole oder war mit Vesikeln ausgefüllt (je ca. 50 %). Die  $\Delta$ fab1-Zellen zeichneten sich durch eine einzelne große Vakuole aus. (b) Einsatz der isolierten  $\Delta$ vps34-Vakuolen im Luciferase-Aufnahme-Assay. Sie nahmen keine Luciferase auf. (c) Einsatz der isolierten temperatursensitiven fab1-2-Vakuolen im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay. Die Sphäroblastierung der Hefezellen erfolgte entweder bei 27 oder bei 37 °C. Zusätzlich wurden die isolierten Vakuolen für 0, 2 oder 5 min bei 37 °C vorinkubiert, bevor ein Standard Luciferase-Aufnahme-Assay mit BY4742  $\Delta$ fab1-Cytosol durchgeführt wurde. Die Temperatur-sensitive Mutante fab1-2 zeigte mit und ohne 37

°C-Inkubation eine höhere spezifische Luciferase-Aufnahme als der Wildtyp FAB1 (Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten).

Der  $\Delta$ fab1-Stamm zeigte bei einer *in vivo* Vakuolen-pH-Messung mit CFDA ein Wildtyp-Signal (105 %). Bei verschiedenen *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Experimenten mit Vakuolen der  $\Delta$ fab1-Hefen im Stammhintergrund BY4742 und BW372 ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse (in manchen Experimenten konnte Luciferase-Aufnahme nachgewiesen werden, in anderen nicht). Deswegen wurden die Experimente zusätzlich mit einer temperatursensitiven Mutante durchgeführt (Abb. 3-3c). Die Zellen wurden bei 27 °C angezogen und die isolierten Vakuolen für die angegebene Zeit bei 37 °C vorinkubiert. In einem weiteren Ansatz wurde die Inaktivierungszeit bei 37 °C zusätzlich durch die Sphäroblastierung bei 37 °C für 26 Minuten verlängert. Die Aufnahmezeit selbst konnte nicht bei 37 °C durchgeführt werden, da auch Wildtyp-Vakuolen unter diesen Bedingungen vollständig inaktiviert werden. Deshalb wurde die *in vitro*-Luciferase-Aufnahme-Reaktion wie bei Standardexperimenten bei 27 °C durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass keine Fab1-Reste im Cytosol Einfluss auf die Reaktion nehmen konnten, wurde für alle Proben  $\Delta$ fab1-Cytosol eingesetzt. In keinem Fall waren die Vakuolen der temperatursensitiven Mutante fab1-2 weniger aktiv als die des Wildtyps FAB1. Auch ohne Inkubation bei 37 °C nahmen diese mehr Luciferase auf als die Wildtypvakuolen. Die *in vitro*-Inkubation bei 37 °C führte zu einer geringen Reduktion der Aufnahme-Aktivität, was aber auch beim Wildtyp der Fall war. Eine Inaktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-5-Kinase der bei 27 °C sphäroblastieren temperatursensitiven Vakuolen durch eine kurze Inkubation *in vitro* bei 37 °C hatte keinen spezifischen Einfluss auf ihre mikroautophagische Luciferase-Aufnahme. Es war kein Temperatur-abhängiger Effekt der *in vitro*-Reaktion zu beobachten. Die Aktivität des Proteins Fab1 ist für die Mikroautophagocytose in Hefe nicht essentiell, wie auch durch Einsatz der Deletionsmutante im *in vivo* Mikroautophagocytose-Assay gezeigt werden konnte (vgl. 3.4.3)

### 3.2.3 Inhibitorstudien: Vps34-Inhibitoren

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung bestimmter Proteine an einem Prozess zu untersuchen, ist der Einsatz spezifischer niedermolekularer Inhibitoren. Dazu setzt man die Inhibitoren im Standard *in vitro*-Assay in steigenden Konzentrationen ein

und beurteilt die Wirkung auf das Ergebnis der Aufnahme-reaktion. Dabei muss überprüft werden, ob die Inhibitoren das Reporterenzym Luciferase hemmen oder die Vakuolen lysieren.

Die Inhibitoren Wortmannin und LY294002 wurden verwendet, um die Säugetier-Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen zu inhibieren (Martin 1998; Vanhaesebroeck, Leever et al. 2001). Dort wirken sie mit hoher Spezifität. Auch in *S.cerevisiae* wurden sie bereits verwendet, um die Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-Synthese zu hemmen (Stack and Emr 1994). Die ScVPS34 ist allerdings weniger sensitiv gegenüber diesen Inhibitoren als die Säugerproteine.

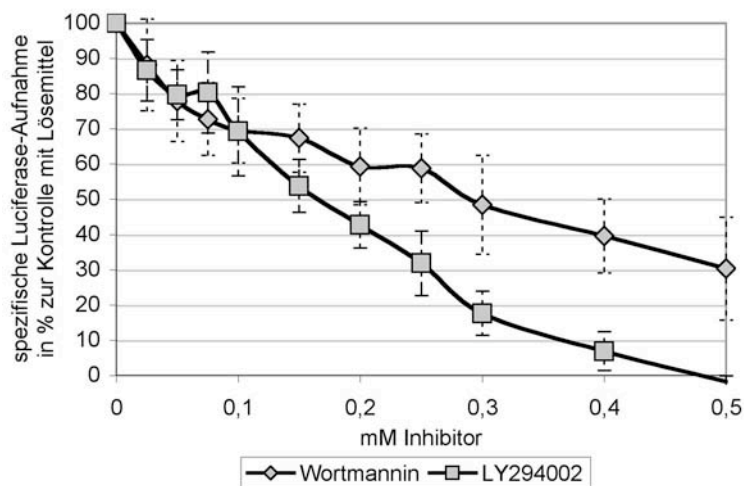


Abb. 3-4: Vps34-Inhibitoren, Titration im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay. Standard-Reaktionsansätze für den Luciferase-Aufnahme-Assay wurden mit den Inhibitoren oder dem Lösemittel (3,1 % (v/v)) für 10 min bei 4 °C vorinkubiert, bevor die Aufnahme-Reaktion bei 27 °C gestartet wurde (Wortmannin 0,4-0,5 mM und Kontrolle dazu mit 4,3 % MeOH).

Es wurden Luciferase-Aufnahmereaktionen mit Wildtyp-Vakuolen und Wildtyp-Cytosol durchgeführt (Abb. 3-4). Die Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der Luciferase und wirkten bei Zugabe zu den Proben auf Eis nicht lytisch auf die Vakuolen (nicht gezeigt). Vor Beginn der *in vitro*-Luciferase-Aufnahme-Reaktion wurde der gesamte Ansatz mit den Inhibitoren 5-10 min auf Eis vorinkubiert. Diese wurden in einer Endkonzentration von 0 bis 0,5 mM eingesetzt. Durch Umsetzen auf 27 °C wurde die Reaktion gestartet. Wortmannin ist schlechter in Methanol löslich als LY294002, so dass die maximale Konzentration von 0,5 mM eine Hemmung auf 30 % bewirkte. Bei 300 µM war eine Reduktion der Aktivität auf 50 % erreicht. LY294002 inhibierte bei 500 µM vollständig, bei 170 µM waren noch

50 % der Aktivität vorhanden. Die PI3-Kinase-Inhibitoren hemmen die Mikroautophagocytose *in vitro*.

Bei der Untersuchung der Vakuolenfusion *in vitro* konnte durch die Sphäroblastierung der Zellen mit Wortmannin (50  $\mu$ M) die Fusionsaktivität stark reduziert werden (20 % Restaktivität: Boeddinghaus, Merz et al. 2002). Im Gegensatz dazu führte die Sphäroblastierung der Hefezellen mit 100  $\mu$ M Wortmannin nicht zu einer Reduktion der Luciferase-Aufnahme *in vitro* und nicht zu einer Erhöhung der Sensitivität der Vakuolen gegenüber Wortmannin (99 % Aktivität nach Sphäroblastierung mit 100  $\mu$ M Wortmannin). Der Zusatz von 100  $\mu$ M Wortmannin zur Luciferase-Aufnahme-Reaktion reduzierte die Aktivität mit und ohne Vorbehandlung der Zellen auf 65 % Restaktivität. Die Luciferase-Aufnahme-Reaktion bei einer Vakuolenkonzentration von 0,2 mg/ml wurde mit hohen Konzentrationen an Cytosol durchgeführt (2,5 mg/ml). Da der Überstand einer 100000 g-Zentrifugation etwa 10 % der VPS34-Aktivität und 50 % des VPS34-Proteins enthält (Schu, Takegawa et al. 1993), beeinflusst Wortmannin bei der *in vitro* Mikroautophagocytose vermutlich vor allem die im Cytosol zugesetzte Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase.

### 3.2.4 Aufreinigung von Proteininhibitoren und Einsatz im *in vitro*-Luciferase-Aufnahme Assay

Es wurden verschiedene Proteindomänen beschrieben, die bestimmte Lipide mit unterschiedlicher Affinität binden. Die so genannte PX-Domäne (Phox-homology-domain), die unter anderem im Hefeprotein Vam7 zu finden ist, interagiert mit Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PI3P) (Cheever, Sato et al. 2001). Eine weitere Proteindomäne, die spezifisch an PI3P bindet, ist die FYVE-Domäne aus *MmHrs* (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate). Die Fusion zweier FYVE-Domänen verstärkt die Bindungsaffinität an PI3P-haltige Trägersubstanzen, da die Dissoziationsrate reduziert wird (Gillooly, Morrow et al. 2000). Für beide Domänen sind Punktmutationen bekannt, die zu einer Inaktivierung der Bindungseigenschaften führen (PX\* mit Y42A und FYVE\* mit C215S). Da die PI3-Kinase-Inhibitoren die Mikroautophagocytose *in vitro* inhibierten, wurde untersucht, ob der Einsatz von Proteinen, die das Produkt der PI3-Kinase-Reaktion binden, einen Einfluss auf die Luciferase-Aufnahme durch Wildtypvakuolen hat.

Die Plasmide für die Expression dieser Domänen als GST-Fusionsproteine wurden mir freundlicherweise von Christian Ungermann (Biochemiezentrum Universität Heidelberg, Deutschland) und Harald Stenmark (Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt.

#### 3.2.4.1 Aufreinigung PX und PX\*

Die GST-Fusionsproteine wurden im *E.coli*-Stamm BI21 für 30 min bei 25 °C exprimiert und parallel aufgereinigt. Aus 4 l PX-Kultur konnten 1,3 mg Protein gereinigt werden, aus 6 l PX\*-Kultur 1 mg. Die gereinigten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Bande bei ca. 18 kDa). Das gefärbte Gel ist in Abb. 3-5a abgebildet. Es sind viele kleinere Protein-Fragmente enthalten. Die Reinigungen wurden drei mal durchgeführt und die Proteine im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay als Inhibitoren eingesetzt. Die Ausbeute einer Proteinreinigung war für ein Experiment ohne Doppelbestimmung ausreichend.

Bei Expression im *E.coli* BI21-Stamm Rosetta (DE3) konnte eine höhere Proteinmenge produziert werden, so dass aus 4 l Kultur nach 6 Stunden Induktion 10 mg Protein aufgereinigt wurde.

#### 3.2.4.2 Aufreinigung FYVE<sub>2</sub> und FYVE<sub>2</sub>\*

Auch GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\* wurden in *E.coli* BI21 bei 30 °C für 2-3 Stunden exprimiert. FYVE<sub>2</sub> konnte in großer Menge aus 2 l Expressionskultur gereinigt werden (10 mg Protein; Abb. 3-5b). GST-FYVE<sub>2</sub>\* befand sich nach der Zellyse und einer Zentrifugation für 30 min bei 11000 g im Überstand, während es nach 40 min bei 30000 g vollständig pelletiert wurde. Aus 4 l Expressionskultur konnte 1 mg Protein gereinigt werden, nachdem die Pufferbedingungen für die Elution von der GSH-Agarose und die Ultrafiltration optimiert worden waren. In PIPES-Puffer pH 6,8 mit 0,2 M Sorbitol und 150 mM Kaliumchlorid präzipitiert FYVE<sub>2</sub>\* bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Durch Zusatz von Glycerin (10 %), Kaliumchlorid (ad 300 mM) und Zinkchlorid (ad 20 µM) konnte die Proteinkonzentration auf 1 mg/ml erhöht werden. Die gereinigten Proteine, sowie das bei der Ultrafiltration ausgefallene FYVE<sub>2</sub>\*-Pellet wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (ca. 22 kDa). Die Coomassie-gefärbten Gele sind in Abbildung 3-5c zu sehen. Das bei der FYVE<sub>2</sub>\*-Reinigung ausgefallene Protein besteht fast ausschließlich aus FYVE<sub>2</sub>\*.

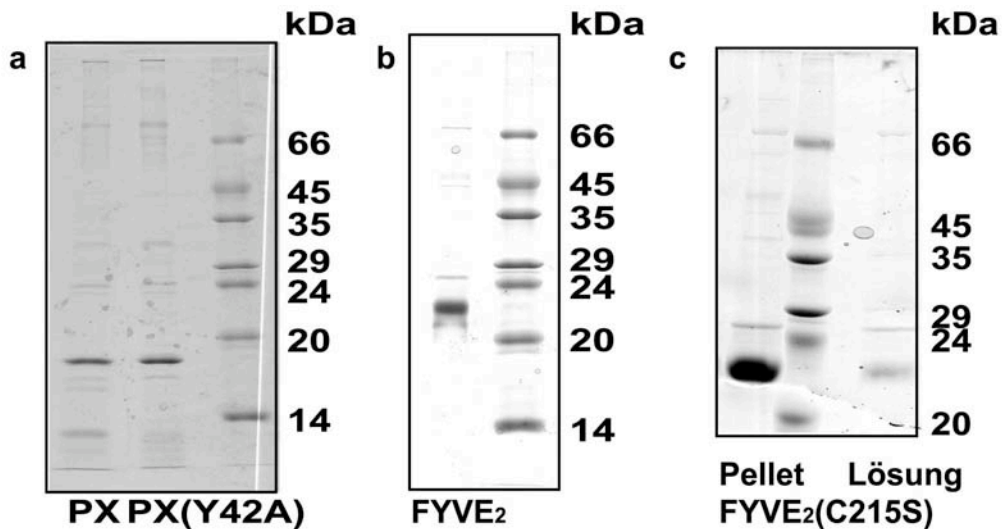


Abb. 3-5: SDS-PAGE der gereinigten Proteindomänen. (a) PX und PX\* bei ca. 18 kDa (b) FYVE<sub>2</sub> bei ca. 22 kDa (c) gereinigtes präzipitiertes FYVE<sub>2</sub>\* (Pellet) sowie das gereinigte Protein in Lösung bei ca. 0,5 mg/ml Proteinkonzentration, ca. 22 kDa.

### 3.2.4.3 Einsatz der Proteindomänen im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay

Die gereinigten Proteine PX, PX\*, FYVE<sub>2</sub> und FYVE<sub>2</sub>\* wurden als Inhibitoren dem *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay mit Wildtypvakuolen zugesetzt. Jede Probe enthielt die gleiche Menge an Ultrafiltrat und steigende Mengen an gelöstem Protein.

Die Ergebnisse dieser Titrationen sind in Abbildung 3-6 zu sehen. PX bewirkte eine Reduktion der Luciferase-Aufnahme auf circa 10 % bei einer Endkonzentration von 2,7 mg/ml, während PX\*, die Negativkontrolle, bei 1,9 mg/ml noch fast 100 % und bei 3,8 mg/ml noch fast 70 % Luciferase-Aufnahme zuließ (Abb. 3-6a). Bei zwei weiteren Proteinreinigungen inhibierte die PX-Domäne ebenfalls in der Größenordnung von 1,5-3 mg/ml auf 10 %. Die PX\*-Domänen aus zwei weiteren Reinigungen führten allerdings auch schon bei 1,5 mg/ml zu einer Reduktion der Luciferase-Aufnahme um 50 %. Die Vakuolen werden nach der Aufnahmereaktion zwei Mal pelletiert. Nach Zugabe von hohen Proteinkonzentrationen (mehr als 1 mg/ml zusätzlich) sind größere Pellets zu beobachten, die schwerer zu resuspendieren sind. Dabei können die Vakuolen auch unspezifisch zerstört werden und die aufgenommene Luciferase verloren gehen.

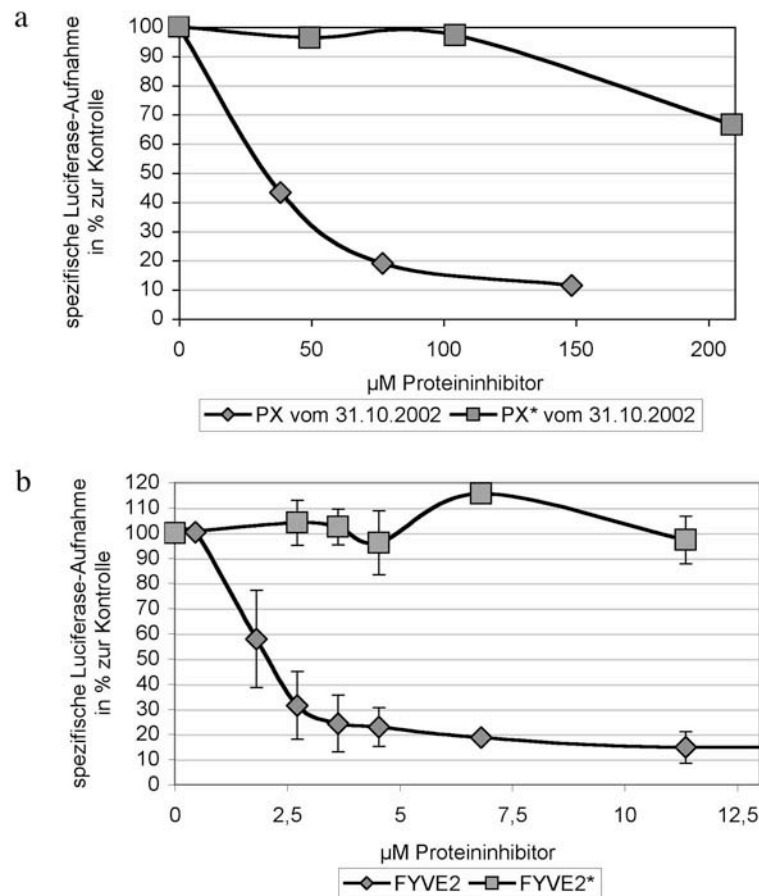


Abb. 3-6: Proteindomänen als Inhibitoren im Luciferase-Aufnahme-Assay. (a) Die PX-Domäne des *S.cerevisiae*-Proteins Vam7 und die mutierte Domäne PX\*. (b) FYVE<sub>2</sub> und FYVE<sub>2</sub>\*. Die PI3P-bindenden Domänen PX und FYVE<sub>2</sub> inhibieren die Luciferase-Aufnahme, während die nicht-bindenden punktmultierten Proteine PX\* und FYVE<sub>2</sub>\* nur in sehr hoher Proteinkonzentration einen Einfluss auf die Aktivität der Vakuolen haben.

Die FYVE<sub>2</sub>-Domäne führte bereits in einer deutlich geringeren Konzentration zu einer Reduktion der Luciferase-Aufnahme-Aktivität (Abb. 3-6b). Bei Zusatz von 0,05 mg/ml FYVE<sub>2</sub>-Protein wurde nur noch 50 % der Luciferase aufgenommen. Dies entspricht einem IC<sub>50</sub> von 2,3 μM. Die maximal verwendbare Konzentration der nicht-PI3P-bindenden FYVE<sub>2</sub>\*-Domäne betrug 0,25 mg/ml. Sie bewirkte keine Reduktion der Luciferase-Aufnahme. Bei Verwendung von FYVE<sub>2</sub> in dieser Menge war hingegen nur noch eine Aktivität von 15 % festzustellen. Durch Bindung des FYVE<sub>2</sub>-Proteins an PI3P, das bereits auf der Vakuolenoberfläche vorhanden ist oder das während der Aufnahmereaktion durch Vps34 gebildet wird, kann die mikroautophagische Luciferase-Aufnahme durch Wildtypvakuolen fast vollständig verhindert werden.

### 3.2.5 Kinetiken der *in vitro*-Luciferase-Aufnahme

Durch kinetische Studien mit Inhibitoren konnte die Luciferase-Aufnahme-Reaktion in verschiedene Phasen eingeteilt werden (Kunz 2002). Dabei folgten die Aufnahmekinetiken entweder einer Reaktion, die durch GTP[ $\gamma$ S oder durch FCCP / Valinomycin gehemmt war. Die Inhibitoren bewirkten also entweder eine frühe oder eine späte Hemmung der *in vitro* Mikroautophagocytose. Um die Vps34-Inhibitoren und die PI3P-bindenden Proteine bezüglich ihres Verhaltens einordnen zu können, wurden kinetische Experimente durchgeführt.

Für die Kinetiken wurde ein mehrfacher Standard-Reaktionsansatz für die Luciferase-Aufnahme-Reaktion angesetzt und bis zu 60 min bei 27 °C inkubiert. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde ein Aliquot von 50  $\mu$ l entnommen und zu 1,5  $\mu$ l vorgelegtem Puffer, Lösemittel oder Inhibitor pipettiert und bis t = 60 min weiter bei 27 °C inkubiert. Nur die 4 °C-Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten in vorgekühlte Gefäße gegeben und bis zum Ende der Reaktionszeit bei 4 °C gehalten. Die Ergebnisse dieser Ansätze stellen die sogenannte Eiskurve dar und geben an, wie viel Luciferase nach der angegebenen Zeit bereits durch die Vakuolen aufgenommen worden war. Alle anderen Proben wurden insgesamt 60 min bei 27 °C inkubiert. Die Experimente wurden 3-4 mal mit unabhängig präparierten Vakuolen durchgeführt. In Abbildung 3-7 sind die im weiteren Text beschriebenen Kurven dargestellt. Das Ergebnis für t = 60 min der Eiskurve beziehungsweise der Methanolkurve für die Lösemittelproben wurde als 100 % gesetzt und der t = 0-Wert der Eiskurve von allen Werten abgezogen.

Die 4 °C-Kontrollkurve mit ihren Standardabweichungen ist in Abb. 3-7a zu sehen (Eiskurve). Während der ersten 20 min wird kaum Luciferase aufgenommen. Nach 30 min sind 20 % des Signals erreicht, nach 45 min bereits 60 %. Die Kontrollkurven für die Zugabe der Proben zum angegebenen Zeitpunkt zum Puffer oder zu Methanol sind in den Abbildungen 3-7a und 3-7b wiedergegeben, die Ergebnisse liegen im Bereich des 60 min-Werts der Eiskurve.

Die GTP[ $\gamma$ S –Kurve ist in Abb. 3-7c dargestellt. Die Verwendung von 3 mM GTP[ $\gamma$ S bei Zugabe zum Zeitpunkt t = 0 min führte zu einer Reduktion der Luciferase-Aufnahme auf 10 %. Nach 20 min Inkubation verlief die Hemmkurve nicht mehr parallel zur



Eiskurve und nach 45 min bewirkte die Inhibitorzugabe fast keine Hemmung mehr. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  FCCP in Kombination mit 2  $\mu\text{M}$  Valinomycin oder durch 0,1  $\mu\text{M}$  Concanamycin A wird der Protonengradient über die Vakuolenmembran zerstört (Abb. 3-7d, e). Diese Kurven verlaufen parallel zur Eiskurve.

Die Zugabe von 0,5 mM LY294002 reduzierte die Luciferase-Aufnahme-Aktivität auf 20 %. Die Zugabe nach 45 und 60 min bewirkte eine Verringerung der Aufnahme auf 80 % des Eiswerts (Abb. 3-7f). Zusätzlich wurde die PX-Domäne als Inhibitor für kinetische Untersuchungen eingesetzt. Sie reduzierte die Luciferase-Aufnahme beim Zeitpunkt  $t = 0$  min auf 20 %, auch bei späteren Zugaben konnte eine weitere Aufnahme des Substrats Luciferase verhindert werden (Abb. 3-7g).

Wortmannin konnte aufgrund seiner geringen Löslichkeit nur in einer Konzentration von 0,3 mM eingesetzt werden und wirkte für kinetische Untersuchungen nicht ausreichend inhibitorisch (nicht gezeigt). Auch der Proteininhibitor FYVE<sub>2</sub> war für diese Experimente nicht geeignet. Bei Zugabe des Inhibitors zu späteren Zeitpunkten (45 und 60 min) konnten nach dem Waschen der Vakuolen nur noch geringere Mengen an Vakuolenprotein nachgewiesen werden (65 bzw. 40 % der ALP-Werte im Vergleich zur Inhibitorzugabe zum Zeitpunkt  $t = 0$  min; Daten nicht gezeigt). Bei Bindung der FYVE-Domänen an benachbart liegende Vakuolen können diese beim Resuspendieren mechanisch zerstört werden. Die Ergebnisse der kinetischen Experimente mit Wortmannin und FYVE<sub>2</sub> wurden zur Einordnung der Inhibitoren in die Phasen der Mikroautophagocytose nicht hinzugezogen.

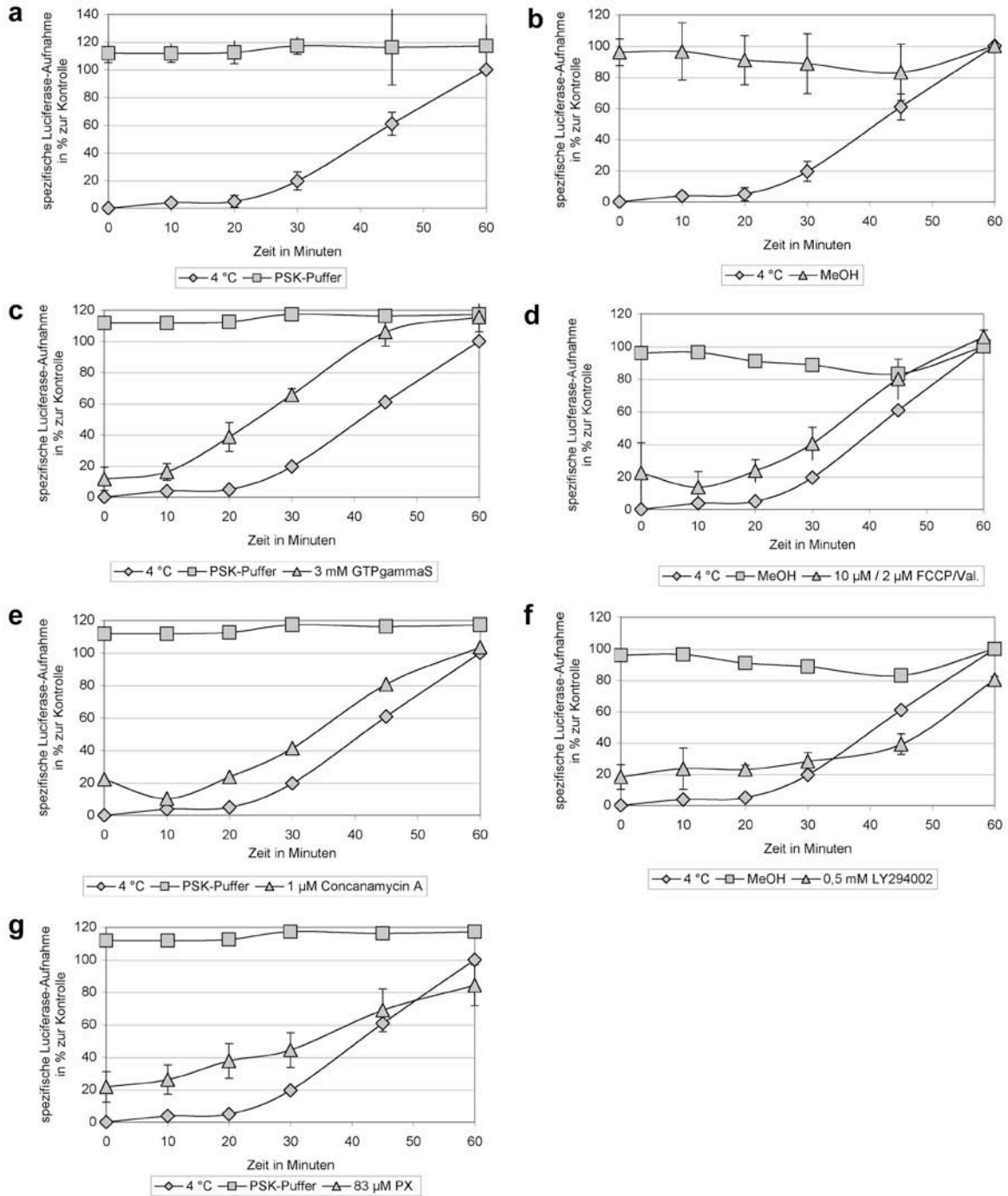


Abb. 3-7: Kinetiken der *in vitro* Luciferase-Aufnahme. Zu den angegebenen Zeiten wurde der Inhibitor bzw. das entsprechende Lösungsmittel zugesetzt oder die Probe auf Eis gestellt. (a) Kontrollkurven 4 °C und Puffer. (b) Kontrollkurven 4 °C und Lösemittel Methanol. (c) GTP $\gamma$ S-Kurve. (d) FCCP / Valinomycinkurve. (e) Concanamycin A-Kurve. (f) LY294002. (g) PX-Domäne.

Bei den in Abbildung 3-7f und 3-7g dargestellten Hemmkurven der PI3P-beeinflussenden Inhibitoren handelt es sich um eine Hemmung auf die Eiskurve, wie es auch für FCCP / Valinomycin und Concanamycin A zu beobachten ist. Der Vps34-

Inhibitor LY294002 und die PI3P-bindende PX-Domäne gehören also zu den späten Inhibitoren der Mikroautophagocytose *in vitro*.

### **3.3 Wirkung der Vps34-Inhibitoren auf ganze Zellen und Lokalisierung von PI3P *in vivo***

Die in 3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von PI3P oder die lokale Verteilung von PI3P bei der Mikroautophagocytose der Hefevakuole eine wichtige Rolle spielen. Deshalb war es von großer Wichtigkeit, die Wirkung der Vps34-Inhibitoren auf die Bildung Autophagischer Schläuche *in vivo* zu charakterisieren und *in situ* zu untersuchen, ob PI3P in den mikroautophagischen Schläuchen zu finden ist.

Die Frequenz der Bildung Autophagischer Schläuche wurde mit Hilfe einer FM4-64-Färbung bestimmt. Zur Lokalisierung des Lipids PI3P *in vivo* wurden Kunststoffschnitte für die Elektronenmikroskopie von Wildtyp-Hefen mit GST-FYVE<sub>2</sub> dekoriert und eGFP-Fusionsproteine der Lipid-Bindedomänen in Hefen exprimiert.

#### **3.3.1 Wirkung der VPS34-Inhibitoren auf die Bildung Autophagischer Schläuche**

Es wurden Zellen des Wildtyp-Hefestamms CRY1 mit FM4-64 angefärbt und vor der mikroskopischen Untersuchung mit den Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 behandelt (je 0,5 mM). Als Kontrolle wurden die Zellen mit der gleichen Menge an Lösungsmittel oder mit 1  $\mu$ M Concanamycin A, einem weiteren Inhibitor der Mikroautophagocytose *in vitro*, versetzt. Die Vps34-Inhibitoren hemmen auch die Endocytose und verhindern bei längerem Zusatz die Färbung durch FM4-64, weshalb sie nur während der letzten 30 min vor der Untersuchung zugesetzt wurden. Es wurde durch eine mikroskopische Analyse der mit FM4-64-gefärbten Vakuolen in ganzen Zellen die Anzahl an Zellen mit großen Vakuolen und die Anzahl der Zellen mit einer großen Vakuole und einer autophagischen Einstülpung ins Vakuolenlumen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-8 dargestellt. Durch Zusatz der Inhibitoren, die eine späte Phase der Mikroautophagocytose beeinflussen (vgl. 3.2.5), wird die Frequenz der Bildung autophagischer Einstülpungen um ca. 50 % reduziert.

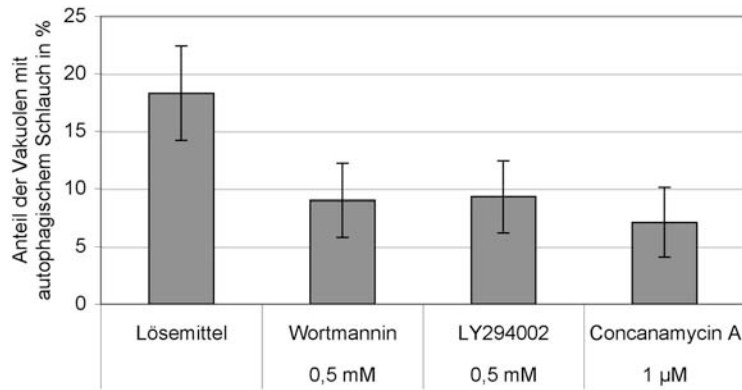


Abb. 3-8: Wirkung der Vps34-Inhibitoren auf die Bildung autophagischer Einstülpungen *in vivo*. CRY1-Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur in Vollmedium wurden für 60 min mit 10 µM FM4-64 gefärbt. Anschließend wurden sie geerntet, in Stickstoffmangelmedium gewaschen und für 3 Stunden darin weiterinkubiert. Während der letzten 30 min wurde Lösemittel oder der angegebene Inhibitor zugesetzt. Es sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.3.2 PI3P-Lokalisierung auf Kunststoffschnitten

GST-FYVE<sub>2</sub> wurde bereits verwendet, um auf Gefrierschnitten von Säugerzellkulturen und von *S.cerevisiae* die Lokalisierung von PI3P nachzuweisen (Gillooly, Morrow et al. 2000). Zur Charakterisierung der mikroautophagischen Schläuche wurden Kunststoffschnitte für die Elektronenmikroskopie verwendet (Muller, Sattler et al. 2000). Da die Bildung und der Erhalt Autophagischer Schläuche ein höchst dynamischer Prozess ist, wurden die Hefen durch Hochdruckgefrieren fixiert und nicht durch die „langsame“ chemische Fixierung wie bei der Herstellung von Gefrierschnitten (z. B. durch Glutaraldehyd bei 30 °C für 30 min).

Zur elektronenmikroskopischen Analyse der Mikroautophagozytose wurde der Wildtypstamm CRY1 eingesetzt. Er zeichnet sich dadurch aus, dass fast alle Zellen nur eine einzelne große Vakuole besitzen. Wenn die Zellen für 4 h in Stickstoffmangelmedium vorbehandelt werden, zeigen sie mikroautophagische Einstülpungen ihrer Vakuolenmembran. Es wurden GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\* als Proteinsonden für die Affinitätsmarkierung von Kunststoffschnitten aufgereinigt, ein  $\Delta$ vps34-Stamm als zusätzliche Negativkontrolle im CRY1-Hintergrund hergestellt und die Substitutionsbedingungen sowie die Markierung der Kunststoffschnitte optimiert.

### 3.3.2.1 Aufreinigung von GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\* für die Affinitätsmarkierung

GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\* wurden in *E.coli* BI21 exprimiert und mittels GSH-Agarose angereichert. Bei einer Elution der Proteine mit Glutathion in einer Konzentration von 4,1 und 3,7 mg/ml kam es bei der Immundekoration zur Bildung von GST-Aggregaten, wie an Klumpen von Goldkörnern zu erkennen war (nicht gezeigt). Bei einer weiteren Reinigung wurden sie in Proteinkonzentrationen von 0,24 und 0,14 mg/ml eluiert und in Endkonzentrationen von 1 und 5 µg/ml für die Immundekoration auf Kunststoffsnitten eingesetzt. Dabei kam es bei GST-FYVE<sub>2</sub>\* weiterhin zur Bildung von Aggregaten, bei GST-FYVE<sub>2</sub> nicht. GST-FYVE<sub>2</sub> wurde als Proteinsonde auf PIP-Strips von Molecular Probes (P-23751, Leiden, NL) in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Es erkannte ausschließlich PI3P (nicht gezeigt).

### 3.3.2.2 Herstellung eines CRY1 $\Delta$ vps34-Hefestamms

Das 5'-Ende des chromosomalen *VPS34*-locus in CRY1 wurde durch den Kan-Marker ersetzt (s. 5.2.3). Die Deletionsmutante CRY1  $\Delta$ vps34 zeichnete sich durch extrem verlangsamtes Wachstum in Vollmedium und eine schlechte Färbbarkeit mit FM4-64 aus. Die Zellen hatten entweder eine große Vakuole oder waren mit vielen Vesikeln ausgefüllt. Dieser Stamm wurde als Negativkontrolle eingesetzt für die Markierung mit GST-FYVE<sub>2</sub>, da er ohne Vps34 kein PI3P synthetisieren kann.

### 3.3.2.3 Optimierung der Affinitätsmarkierung auf Kunststoffsnitten

Die Bedingungen für die Affinitätsmarkierungen mit den Proteinsonden GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\*, sowie mit dem Anti-GST-Antikörper aus Ziege mussten optimiert werden. Fettsäurefreies BSA wurde in Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 % und in Kombination mit GST-FYVE<sub>2</sub>-Konzentrationen von 1 bis 50 µg/ml ausgetestet. Der Anti-GST wurde in Konzentrationen von 2,5 µg/ml bis 0,1 mg/ml für die Markierung von Kunststoffsnitten eingesetzt. Der Zusatz von 2 % BSA mit 1 oder 5 µg/ml GST-FYVE<sub>2</sub> in Kombination mit einer Anti-GST-Konzentration von 5 µg/ml lieferte den geringsten Hintergrund auf den  $\Delta$ vps34-Zellen und das beste Signal auf den Wildtypzellen (5.1.2).

### 3.3.2.4 Optimierung der Substitutions- und Einbettungsbedingungen für die Affinitätsmarkierung auf Kunststoffschnitten

Es wurden verschiedene Substitutionsbedingungen und Einbettungsmedien für die Herstellung der Kunststoffschnitte und die Erhaltung des Lipids PI3P in Hefezellen getestet. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 3-2 aufgelistet.

Tabelle 3-2: Lokalisierung von PI3P in Kunststoffschnitten von Hefezellen (5.2.5).

Fixativ	Kunststoff	PI3P-Lokalisierung mit GST-FYVE <sub>2</sub> im WT
Uranylacetat	Lowicryl K11M	Nein
Glutaraldehyd	Lowicryl K11M	Diffus überall
Osmiumtetroxid	Epon	Nein
Osmiumtetroxid	LR-White	Ja, Zellen reißen bei der Polymerisierung
Acrolein	Lowicryl K11M	Ja

In Abbildung 3-9a / b sind mit Osmiumtetroxid fixierte in Epon eingebettete Zellen zu sehen. Die Wildtypzellen hatten meist eine große Vakuole und bei einem Teil der Zellen war ein Querschnitt durch einen Autophagischen Schlauch zu sehen (Abb. 3-9a). Die  $\Delta$ vps34-Zellen zeigten zwei Vakuolen-Phänotypen. Entweder enthielten sie eine große Vakuole (Abb. 3-9b) oder ihr Cytoplasma war angefüllt mit vielen Vesikeln (nicht gezeigt), Autophagische Schläuche waren nicht vorhanden.

Bei der Substitution mit Uranylacetat / Lowicryl und Osmiumtetroxid / Epon konnte keine spezifische Markierung der Wildtypzellen im Vergleich zu den  $\Delta$ vps34-Zellen erreicht werden. Bei der Einbettung in Lowicryl nach einer Glutaraldehyd-Fixierung war eine starke Markierung der Wildtypzellen zu beobachten, während die Deletionsmutante nicht markiert wurde. Allerdings lokalisierte das Signal diffus überall in den Zellen. Das bedeutet, Glutaraldehyd ließ die Markierung zu, fixierte aber das Lipid PI3P nicht ausreichend.

Nach einer Fixierung durch Osmiumtetroxid und der Einbettung in LR-White war eine spezifische Markierung der Wildtyp-Vakuolenmembran durch GST-FYVE<sub>2</sub> möglich, während die Deletionsmutante nicht markiert wurde (Abb. 3-9c / d). Allerdings erfolgte die Polymerisierung von LR-White bei 60 °C, was dazu führte, dass viele Zellen zerrissen wurden.

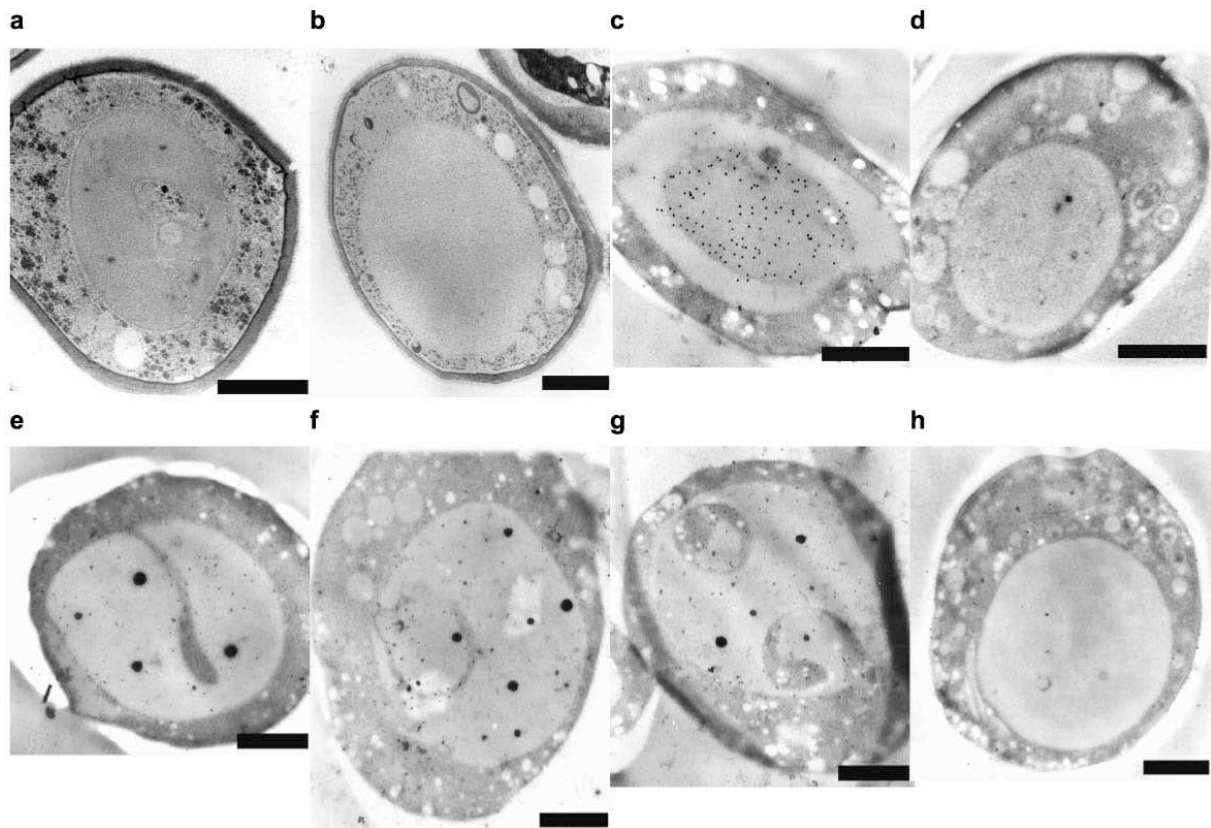


Abb. 3-9: Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie. CRY1 oder CRY1  $\Delta$ vps34 nach 4 h in Stickstoffmangelmedium (5.2.5). (a) CRY1 fixiert mit  $\text{OsO}_4$  eingebettet in Epon (b) CRY1  $\Delta$ vps34 fixiert mit  $\text{OsO}_4$  eingebettet in Epon. (c) CRY1 fixiert mit  $\text{OsO}_4$  eingebettet in LRW, 1  $\mu\text{g/ml}$  GST-FYVE<sub>2</sub> (d) CRY1  $\Delta$ vps34 fixiert mit  $\text{OsO}_4$  eingebettet in LRW, 1  $\mu\text{g/ml}$  GST-FYVE<sub>2</sub> (e-g) CRY1 fixiert mit Acrolein eingebettet in K11M, 5  $\mu\text{g/ml}$  GST-FYVE<sub>2</sub> (d) CRY1  $\Delta$ vps34 fixiert mit Acrolein eingebettet in K11M, 5  $\mu\text{g/ml}$  GST-FYVE<sub>2</sub>. Balkenlänge entspricht 1  $\mu\text{m}$ . Die Beispiel-Abbildungen e-h sind im Anhang vergrößert dargestellt, die quantifizierten Goldkörner sind dort zur besseren Beurteilung mit einer Markierung versehen.

Eine weitere Möglichkeit, Kunststoffschnitte von Hefezellen herzustellen war die Fixierung durch Acrolein, was wieder eine Polymerisierung von Lowicryl-Kunststoffen durch UV-Licht bei  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  erlaubte. Leider gab es in diesen Präparaten viele unspezifische Verschmutzungen (schwarze Bereiche mit einem Durchmesser von mehr als 15 nm; die Goldmarkierung besteht aus Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 15 nm). Die mit Acrolein fixierten, in Lowicryl eingebetteten Kunststoffschnitte wurden für die Quantifizierung eingesetzt, da es durch diese schonenden Bedingungen möglich war, besser erhaltene Zellen spezifisch mit GST-FYVE<sub>2</sub> zu markieren (Abb. 3-9e-h, diese Abbildungen sind im Anhang vergrößert dargestellt und die für die Quantifizierung eingesetzten Goldpartikel sind mit einer Markierung versehen).

### 3.3.2.5 Quantifizierung der PI3P-Lokalisierung

Es wurden 47 Zellen mit Einstülpungen der Vakuolenmembran quantifiziert. Sie besaßen eine Vakuolenmembranlänge von 336  $\mu\text{m}$  und eine Länge der Einstülpungen von 182  $\mu\text{m}$ . Es lokalisierten 471 Goldkörner zur Außenmembran und 487 Goldkörner zu den Einstülpungen. Das heißt auf der Außenmembran konnten 1,4 Goldkörner pro  $\mu\text{m}$  gefunden werden, in den Einstülpungen 2,7. Der Hintergrund an Markierung, der auf  $\square$ vps34-Zellen bestimmt wurde, betrug 0,14 Goldkörner pro  $\mu\text{m}$  Membranlänge. Die Gesamtdichte an PI3P in den autophagischen Einstülpungen war also doppelt so hoch wie auf der Außenmembran der Vakuole.

### 3.3.3 Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in Hefen

Um *in vivo* die cytosolisch zugänglichen PI3P-Lipide sichtbar zu machen, wurden die Proteindomänen als eGFP-Fusionsproteine in Hefevektoren kloniert, diese in Hefezellen exprimiert und ihre Lokalisierung durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

#### 3.3.3.1 Umklonierung von PX, PX\*, FYVE<sub>2</sub> und FYVE<sub>2</sub>\* in Hefe-Expressionsvektoren und Expression der eGFP-Konstrukte in Hefe

Zur Expression in Hefe wurden die Promotoren Met25 und Gal1 auf CEN6/ARSH-Plasmiden gewählt, die den URA3-Hefeselektionsmarker tragen. Die Umklonierungen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt und die Korrektheit der Klonierungen durch Sequenzierung bestätigt.

Der Promotor Met25 führt in Vollmedium zu einer basalen Expression der Plasmid-kodierten Proteine, wobei die Stärke der Expression innerhalb der Wildtypen und zwischen Wildtyp und Mutanten stark variierte. Zum Beispiel exprimierte CRY1 in Vollmedium doppelt soviel Fusionsprotein wie BY4742 und CRY1  $\square$ pep4. Die Expression in BY4742-Deletionsmutanten war noch einmal um die Hälfte niedriger. Die Stickstoffmangelbedingungen führten zur einer Verstärkung der Expression der Fusionsproteine. Allerdings produzierten die Wildtypen mehr zusätzliches Protein als die Mutanten, was den Unterschied in der Expressionsstärke weiter vergrößerte. Dieser Promotor war nicht geeignet, um Deletionsmutanten zu untersuchen, da diese im Vergleich zu ihrem Wildtyp weniger Fusionsprotein exprimierten. Zur strukturellen Charakterisierung der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Lokalisierung im Wildtypstamm CRY1 hingegen



wurde dieser Promotor eingesetzt, da die Zellen direkt aus einer Kultur mit logarithmischem Wachstum geerntet und in Stickstoffmangelmedium weiter inkubiert werden konnten. Es war kein zusätzlicher Medienwechsel nötig, der das Wachstumsverhalten der Zellen hätte beeinflussen können.

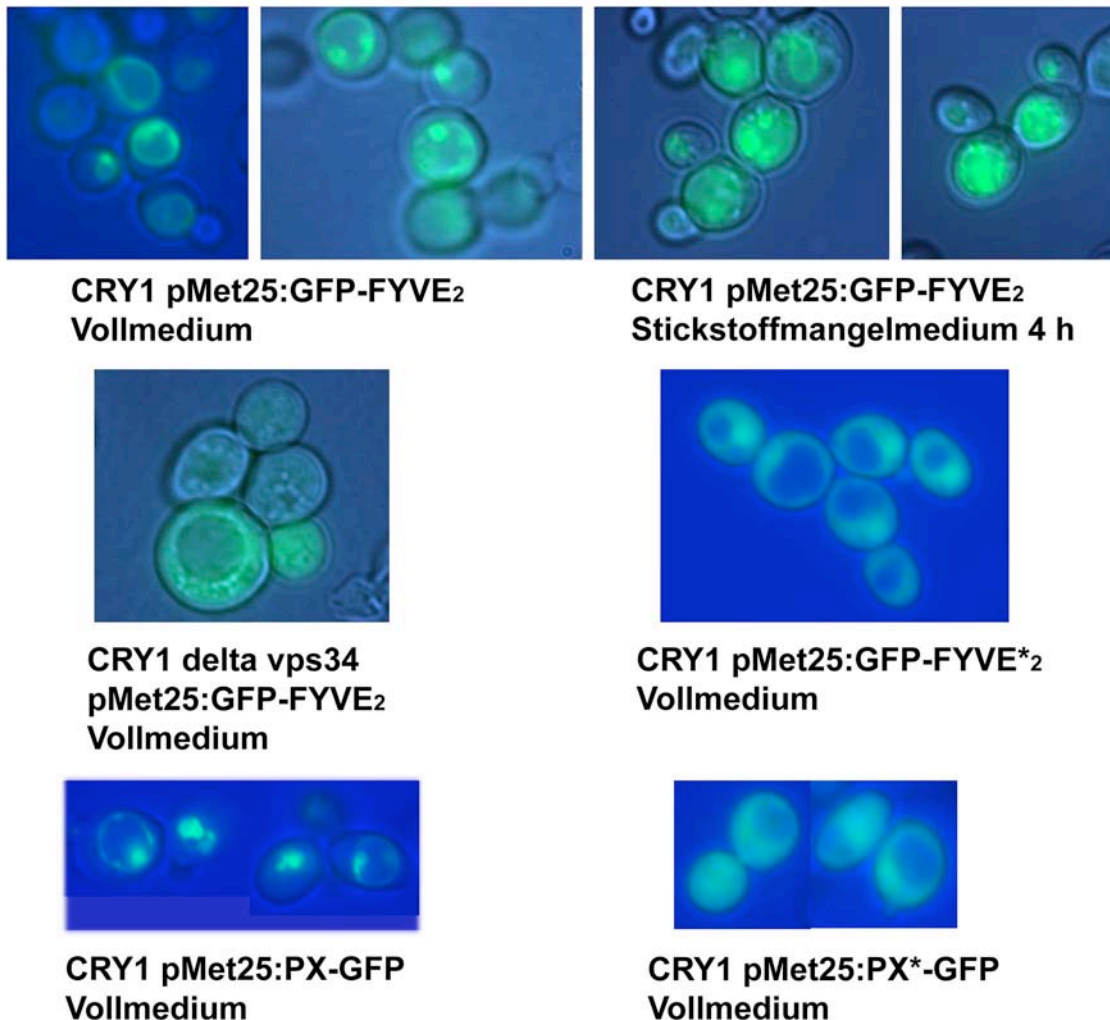


Abb. 3-10: Expression von eGFP-Fusionsproteinen in *S.cerevisiae* CRY1 oder CRY1  $\Delta$ vps34 unter Kontrolle des Met25-Promotors auf einem Cen-Plasmid nach einer Übernachtskultur in Vollmedium oder nach einer anschließenden 4-stündigen Inkubation in Stickstoffmangelmedium.

In Abbildung 3-10 ist die eGFP-FYVE<sub>2</sub> und eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*-Expression in CRY1 und in CRY1  $\Delta$ vps34 zu sehen. eGFP-FYVE<sub>2</sub> ist in Vollmedium in CRY1 nur auf der Vakuolenmembran lokalisiert. Es sind stärker fluoreszierende Bereiche auf der Membran und an nach innen gerichteten Einstülpungen zu beobachten. In CRY1  $\Delta$ vps34 verteilt sich eGFP-FYVE<sub>2</sub> gleichmäßig im Cytosol. eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*, das kein PI3P mehr binden kann, ist auch im Wildtyp nur im Cytosol und verstärkt im Zellkern

zu sehen. Alles PI3P, das dem Cytosol zugewandt ist, lokalisiert zur Oberfläche der Vakuolenmembran. Nach einer Inkubation von 4 h in Stickstoffmangelmedium kann eGFP-FYVE<sub>2</sub> im Wildtyp verstärkt an Vesikeln und Einstülpungen im Vakuolenlumen nachgewiesen werden.

Die Fusionsproteine PX-eGFP und PX\*-eGFP wurden ebenfalls in CRY1 exprimiert. Dabei lokalisierte PX\*-eGFP ausschließlich ins Cytosol, während PX-eGFP etwa zur Hälfte auf der Vakuolenmembran detektiert wurde (Abb. 3-10). Die Affinität einer einzelnen Lipid-Bindedomäne zu einer Lipid-haltigen Membran ist viel geringer als die Affinität der Doppel-FYVE-Domänen (Gillooly, Morrow et al. 2000). Auch in den *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Experimenten konnte FYVE<sub>2</sub> in viel geringerer Konzentration eingesetzt werden als PX (0,2 mg/ml bzw. 2 mg/ml zur Hemmung). Aus diesem Grund wurde für weitere Experimente das eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Protein eingesetzt.

Um die Expression der eGFP-Fusionsproteine in verschiedenen Mutanten vergleichen zu können, wurden die Konstrukte in Plasmide mit dem Gal1-Promotor überführt. In Vollmedium ist der Promotor vollständig reprimiert. Es konnte keine eGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Expression wurde mit verschiedenen Galactosekonzentrationen zur Induktion untersucht. Bei 4 % Galactose waren in CRY1 nach 2 h einzelne fluoreszierende Zellen zu erkennen, nach 5-6 Stunden war ein Maximum erreicht. Die Induktion mit 0,2 % Galactose führte zu einer länger anhaltenden gleichmäßigeren Expression. In BY4742 waren mit 0,2 % Galactose bei gleicher Induktionszeit mehr fluoreszierende Zellen zu sehen. Außerdem war bei einer höheren Galactosekonzentration größere Unterschiede zwischen den Zellen einer Kultur zu beobachten. Einige Deletionsmutanten benötigten längere Induktionszeiten (siehe unten) um eine ähnliche eGFP-Fluoreszenzintensität wie ihr Wildtyp zu zeigen. Deshalb wurde bei Galactose-induzierter eGFP-Expression für jeden Hefestamm die Zeit bestimmt, nach der ähnliche Mengen an eGFP in den Zellen vorlag. Durch die Induktionsbedingungen mit Galactose in Glucose-freiem Medium liegen für das Wachstum der Hefezellen keine optimalen Bedingungen vor. Bei einer FM4-64-Färbung des Wildtyps und einer „class E“-Endocytose-Mutante konnte z.B. nach der Inkubation in Galactose-Medium kein Unterschied in der Vakuolenstruktur mehr festgestellt werden („class E“-Phänotyp; vgl. 3.5). Aus diesem Grund wurde die Induktionszeit so kurz wie möglich gewählt, um ausreichende

---

Fluoreszenz zu sehen ohne den Zellen zu sehr zu schaden. Die Wildtypen wurden für 3-5 h in Galactose-Medium 0,2 % induziert, manche Mutanten wie z.B. die  $\Delta$ vps34 und die  $\Delta$ stp22-Mutanten für 7 h.

### 3.3.3.2 Veränderung der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Lokalisierung durch Stickstoffmangel

Bei der mikroskopischen Analyse eGFP-FYVE<sub>2</sub>-exprimierender Zellen konnten unterschiedliche Strukturen beobachtet werden. Die Membranoberfläche aller Vakuolen war durch eGFP-FYVE<sub>2</sub> markiert. Zusätzlich zur schwachen Fluoreszenz der Vakuolenoberfläche gab es Vakuolen mit stärker fluoreszierenden Bereichen auf der Membran sowie Vakuolen mit stärker fluoreszierenden Schläuchen oder Vesikeln im Lumen. Diese Vesikel waren entweder noch mit der Vakuolenmembran verbunden oder bewegten sich frei im Lumen der Vakuolen. Beispiele für die verschiedenen Strukturen sind in Abb. 3-11a dargestellt (Phänotypen 1-5). Es handelt sich dabei nicht um so genannte „Multivesicular body“-Vesikel, da diese Strukturen mit dem Lichtmikroskop nicht aufzulösen sind (Yeo, Xu et al. 2003).

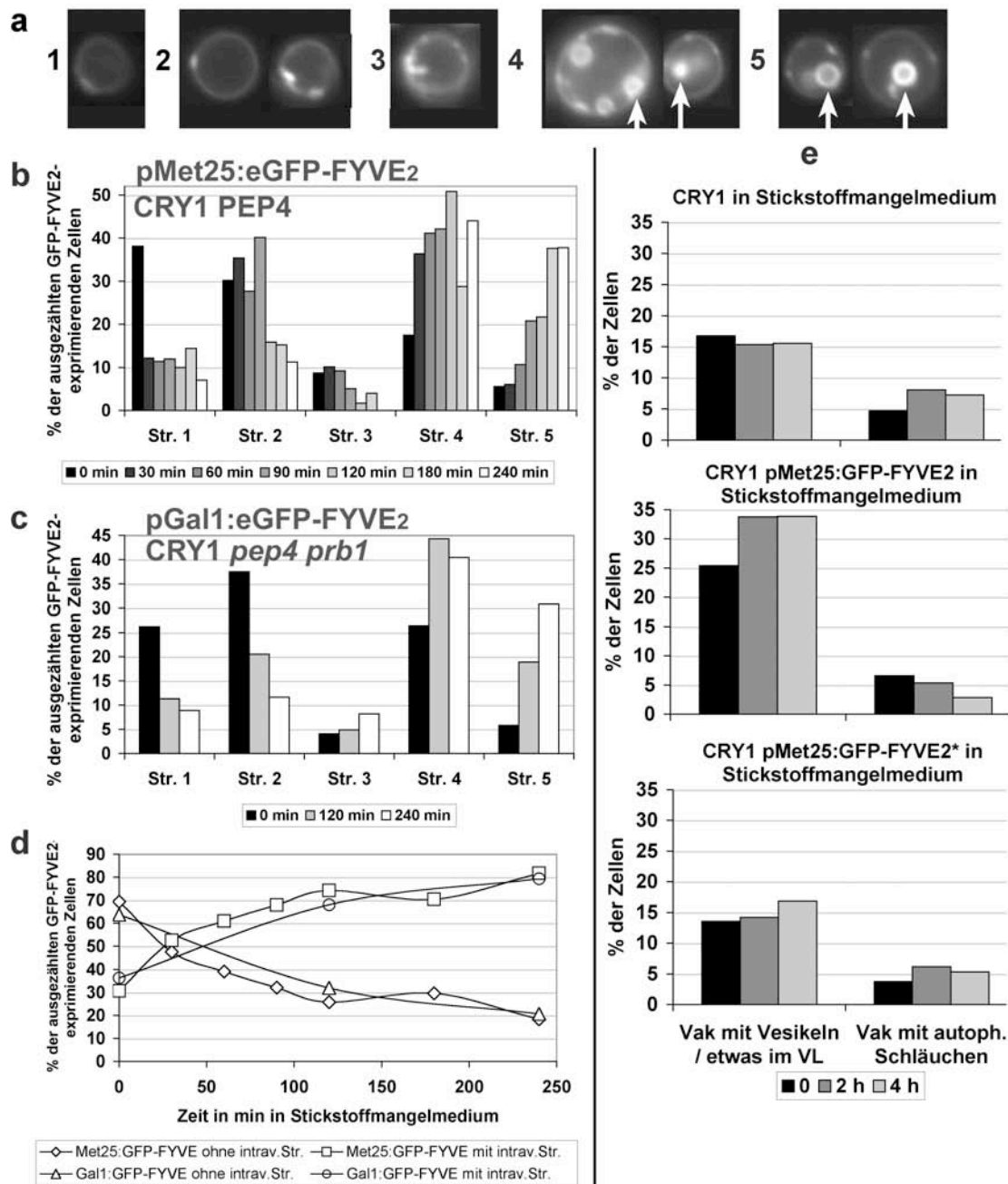


Abb. 3-11: Verteilung der Fluoreszenzstrukturen bei Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub>.

(a) Phänotypen der fluoreszierenden Vakuolen: 1. eine einzelne schwach fluoreszierende Vakuole 2. Stellen mit höherer Fluoreszenzintensität auf der Vakuolenmembran 3. stärker fluoreszierender Autophagischer Schlauch 4. kleinere Vesikel im Vakuolenlumen (mit weißem Pfeil markiert) 5. größere Vesikel im Vakuolenlumen (mit weißem Pfeil markiert). (b) Verteilung der Strukturphänotypen in CRY1 transformiert mit pMet25:eGFP-FYVE<sub>2</sub> nach 0 bis 240 min Inkubation in Stickstoffmangelmedium. Pro Zeitpunkt wurden 200-300 Zellen quantifiziert. (c) Verteilung der Strukturphänotypen in CRY1  $\Delta$ pep4  $\Delta$ prb1 transformiert mit pGal1:YFP-FYVE<sub>2</sub> nach 5 h Induktion in Galactose-Medium und 4 h in Vollmedium. Die Fluoreszenzstrukturen wurden anschließend nach 0, 120 und 240 min in Stickstoffmangelmedium ausgezählt. Pro Zeitpunkt wurden 200-500 eGFP-FYVE<sub>2</sub>-exprimierende Zellen quantifiziert. (d) Vergleich der Zellen ohne und mit intravakuolärer Struktur (Phänotyp 1+2 bzw. 3+4+5) der Experimente b und c. (e) FM4-64-Färbung ohne und mit Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> oder eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*. Anzahl der Zellen mit Vesikeln oder Schläuchen im Vakuolenlumen in %.

Die Zellen aus Vollmedium zeigen vor allem fluoreszierende Vakuolen, die gleichmäßige Fluoreszenz der Vakuolenmembran und zum Teil stärker fluoreszierende Bereiche auf der Vakuolenoberfläche besitzen. Nach einer zusätzlichen Inkubation in Hungermedium verschiebt sich die Verteilung der Fluoreszenzstrukturen hin zu mehr Vakuolen mit Vesikeln in ihrem Lumen (Durchmesser der Vesikel 0,2 bis 1  $\mu\text{m}$ ). Um die Veränderung der Strukturen durch den Stickstoffmangel beurteilen zu können, wurden die verschiedenen Strukturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Stickstoffmangelmedium quantifiziert. Dazu wurden CRY1-Zellen transformiert mit pMet25:eGFP-FYVE<sub>2</sub>. Um auszuschließen, dass die unter Stickstoffmangel beobachteten Strukturen artifiziell durch das neu synthetisierte eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Protein erzeugt werden, wurde das Experiment zusätzlich mit CRY1  $\Delta$ pep4  $\Delta$ prb1 transformiert mit pGal1:CFP-FYVE<sub>2</sub> durchgeführt. Es wurden pro Zeitpunkt 200-500 fluoreszierende Zellen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-11b und c dargestellt. Die Zahl der Zellen mit einer einfachen runden Vakuole (Struktur 1) oder mit einzelnen fluoreszierenden Bereichen auf der Vakuolenoberfläche (Struktur 2) nimmt mit der Zeit ab, während die Zahl der Zellen mit kleinen oder großen Vesikeln im Vakuolenlumen zunimmt (Strukturen 3-5; Abb. 3-11d). Dies ist sowohl bei den Zellen der Fall, die eGFP-FYVE<sub>2</sub> während der Hungerphase neu synthetisieren (Met25-Promotor; Abb. 3-11b) als auch bei denen, die bereits vorhandenes Lipid-gebundenes Protein umsortieren (Gal1-Promotor; Abb. 3-11c). Das heißt, durch den Stickstoffmangel erfolgt ein gezielter Transport von Membranmaterial von der Vakuolenoberfläche ins Lumen der Vakuole, was durch Beobachtung der Umverteilung des Lipid-gebundenen eGFP-FYVE<sub>2</sub> verfolgt werden kann. Durch Extrapolation der Fluoreszenz über die Gesamtoberfläche der Vakuole und über die stärker leuchtenden Strukturen kann abgeschätzt werden, welcher Anteil der Gesamtfluoreszenz zu den kleineren Strukturen lokalisiert. Die Menge der gebundenen Fluoreszenz wurde unter Annahme der Kugel- / Zylinderform der Vakuole / Strukturen für die jeweiligen Oberflächen berechnet. In Vakuolen der Kategorie 2 befindet sich ca. 5 % der Fluoreszenz in den stärker fluoreszierenden Bereichen. In dem hier abgebildeten Autophagischen Schlauch (Struktur 3) ist 20 % und in den Vakuolen mit mehreren Vesikeln (4, 5) bereits bis zu 60 % der Fluoreszenz in diesen angereichert.

Bei einer FM4-64-Färbung von Wildtypzellen in Stickstoffmangelmedium sind zum Teil Vesikel im Vakuolenlumen zu sehen und zum Teil Autophagische Schläuche zu erkennen. Die bei der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Expression auftretenden größeren Vesikel sind so nicht zu beobachten. Deshalb wurde vergleichend eine FM4-64-Färbung durchgeführt an CRY1-Zellen, die kein Plasmid enthielten oder eGFP-FYVE<sub>2</sub> bzw. eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* exprimierten. Das exprimierte eGFP kann mit dem FM4-64-Filter am Mikroskop nicht detektiert werden. Ohne Plasmid oder mit eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* sind bei der FM4-64-Färbung ein gleicher Anteil an Zellen mit Vesikeln im Vakuolenlumen und ein leichter Anstieg der Zellen mit Autophagischem Schlauch zu beobachten. Bei Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> hingegen ist schon in Vollmedium ein höherer Prozentsatz an Zellen mit Vesikeln im Vakuolenlumen zu sehen, der durch Stickstoffmangel ansteigt, während die Anzahl an Autophagischen Schläuchen abnimmt (Abb. 3-11e). Das bedeutet, dass die Bindung von eGFP-FYVE<sub>2</sub> an die Vakuolenmembran möglicherweise PI3P stabilisiert und so die Anzahl und Größe der Einstülpungen verändert.

### 3.3.3.3 Die FYVE<sub>2</sub>-Konzentration auf der Vakuolenmembran *in vivo* hemmt die Mikroautophagocytose nicht

Die Proteindomäne FYVE<sub>2</sub> kann *in vitro* als Inhibitor der Mikroautophagocytose eingesetzt werden (s. 3.2). Deshalb sollte geklärt werden, ob die Expression dieses Proteins in Hefen auch zu einer Hemmung der Mikroautophagocytose führt. Da *in vivo* alles eGFP-FYVE<sub>2</sub> auf der Vakuolenoberfläche lokalisiert, können die molaren Verhältnisse an FYVE<sub>2</sub> und Vakuolenprotein *in vitro* und *in vivo* direkt verglichen werden. Um das Verhältnis von Vakuolenmembran zu FYVE<sub>2</sub>-Proteinkonzentration *in vivo* zu bestimmen, wurde die Methode des Quantitativen Western Blots eingesetzt.

*In vitro* führt der Zusatz von 0,2 mg/ml FYVE<sub>2</sub>-Protein zu einer Hemmung der Luciferase-Aufnahme auf 10 % bei einer Vakuolenkonzentration von 0,2 mg/ml im Assay. Das entspricht einem Verhältnis von 9 pmol FYVE<sub>2</sub>-Protein zu 0,2 µg Vakuolenprotein.

Als Marker für die Menge an Vakuolenprotein in gereinigten Vakuolen oder in ganzen Zellen wurde das Protein Alkalische Phosphatase verwendet, das mit dem monoklonalen Antikörper Anti-ALP nachgewiesen werden kann. Durch Proteinbestimmung der isolierten Vakuolen und durch Vergleich der ALP-Signale im

Western Blot aus isolierten Vakuolen und Ganzzell-Proteinextrakten kann die Menge an Vakuolenprotein darin bestimmt werden (Abb. 3-12).

Um anhand des eGFP-Signals im Western Blot auf die molare Menge an FYVE<sub>2</sub> zurückzurechnen, wurde *EGFP* aus dem Hefe-Expressionsvektor in einen *E.coli*-Vektor umklontiert, exprimiert und das Protein mit Hilfe eines „his-tags“ aufgereinigt. Es wurden verschiedene Mengen an gereinigtem Protein zusammen mit den Hefe-Proteinextrakten durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Wenn die Signale im Western Blot etwa die gleiche Intensität aufwiesen, wurde davon ausgegangen, dass ähnliche Mengen an eGFP in den Proben waren. Durch Einrechnung des molaren Gewichts des eGFP-V5-His6-Proteins von ca. 32000 g/mol konnte die molare Menge an FYVE<sub>2</sub>-Protein in den Hefe-Proteinextrakten abgeschätzt werden, da im Fusionsprotein eGFP-FYVE<sub>2</sub> eGFP und FYVE<sub>2</sub> in gleicher molarer Konzentration vorliegen (Abb. 3-12).

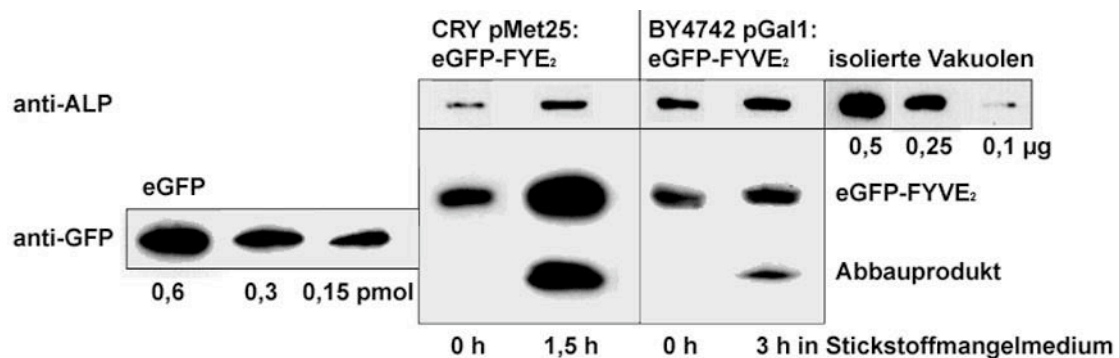


Abb. 3-12: Quantitative Western Blot-Analyse der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-exprimierenden Hefestämme.

Es wurden Zellen aus Vollmedium (0 h) oder nach 1,5 oder 3 h in Stickstoffmangelmedium geerntet, Proteinextrakte daraus gewonnen und diese in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich wurden bestimmte Mengen an isolierten Hefevakuolen oder isoliertem eGFP-Protein aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und entweder ALP oder eGFP mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die Intensität der Signale wurde innerhalb eines Röntgenfilms verglichen und daraus die Menge an ALP oder eGFP-Fusionsprotein in den Ganzzellproteinextrakten bestimmt.

Bei Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in CRY1 unter Kontrolle des Met25-Promotors waren in Vollmedium etwa 0,8 pmol FYVE<sub>2</sub> auf 0,2 µg Vakuolen exprimiert. Bereits nach 1,5 h in Stickstoffmangelmedium war die eGFP-Menge auf das dreifache angestiegen, ein Abbauprodukt des Fusionsproteins war im Western Blot zu sehen. Es wurden 0,8 pmol FYVE<sub>2</sub> bereits abgebaut, während 1,6 pmol noch als Volllängeprotein vorlagen. Zu Beginn der Inkubation unter Stickstoffmangel-Bedingungen betrug die molare Konzentration an FYVE<sub>2</sub> etwa 1/10 der

Konzentration, die für die Hemmung der Mikroautophagocytose *in vitro* notwendig war. Bereits nach 1,5 Stunden waren Abbauprodukte des Fusionsproteins zu sehen, die von einem mikroautophagischen Prozess herrührten, wie in 3.4 näher dargestellt werden wird.

Bei Verwendung des Gal1-Promotors zur Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in Hefe wurde in Galactose-Medium eine bestimmte Menge an Fusionsprotein synthetisiert. Die weitere Expression wurde durch einen Medienwechsel zu einem Medium mit Glucose gestoppt. Direkt nach der Induktion oder nach einer zusätzlichen Wachstumsphase in Vollmedium war nur das Volllängeprotein nachzuweisen. Für die in 3.4 dargestellten Experimente mit BY4742 und Deletionsmutanten in diesem Stammhintergrund wurde der Gal1-Promotor verwendet, da die Induktion in schlechter exprimierenden Mutanten verlängert werden konnte. Die Expression wurde für jede Mutante optimiert, so dass ein ähnliches Expressionsniveau wie im Wildtyp BY4742 nach 4-5 h erreicht wurde. Nach einer vierstündigen Expression bestand im Wildtyp ein Verhältnis von ca. 0,16 pmol eGFP-FYVE<sub>2</sub> auf 0,2 µg Vakuolen. Diese Konzentration lag weit unter der inhibitorischen Konzentration von 9 pmol FYVE<sub>2</sub> pro 0,2 µg isolierten Vakuolen. Unter Verwendung dieses Promotors wurde keine inhibitorische FYVE<sub>2</sub>-Konzentration *in vivo* erreicht.

#### 3.3.3.4 Quantifizierung der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Fluoreszenz

Nach 4 h Stickstoffmangel waren in eGFP-FYVE<sub>2</sub>-exprimierenden Zellen vermehrt stärker fluoreszierende Vesikel im Vakuolenlumen zu sehen. Um nachzuweisen, dass diese Vesikel wirklich im Lumen der Vakuolen zu finden waren, wurden die Zellen am Konfokalen Mikroskop untersucht.

Es wurden optische Schnitte durch pMet25:eGFP-FYVE<sub>2</sub>-exprimierende CRY1-Zellen aufgenommen. Ein Beispiel für solch ein Fluoreszenzbild ist in Abbildung 3-13 dargestellt. Der fluoreszierende Umriss stellt die Vakuolenmembran dar. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die stark fluoreszierenden Einstülpungen / Vesikel im Vakuolenlumen lokalisieren. An dieser Aufnahme ist auch zu erkennen, dass die Membran der Einstülpung durchgängig mit der Außenmembran der Vakuole ist und das Lumen der Einstülpung in Verbindung steht mit dem Cytosol.



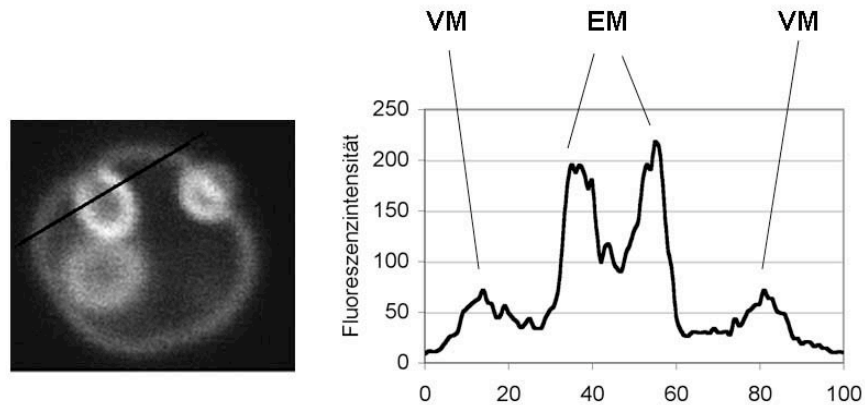


Abb. 3-13: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität auf Konfokalen Aufnahmen. Die Fluoreszenzintensität der vakuolären Strukturen, wie in dem Fluoreszenzbild zu sehen, wurden mit dem Computerprogramm ImageJ ausgewertet. Die in dem Bild (links) enthaltenen Informationen zur Fluoreszenzintensität sind in der Auftragung gegen die Distanz auf der schwarz markierten Linie in dem Diagramm rechts wiedergegeben (VM: Vakuolenmembran; EM: Membran der autophagischen Einstülpung).

Die Auswertungen der Konfokal-Aufnahmen erfolgten mit dem Computerprogramm ImageJ. Die schwarze Linie durch die Zelle (Abb. 3-13) markiert den Bereich, über den ein Histogramm der Fluoreszenzintensität berechnet wurde. Dieser Querschnitt ist in Abb. 3-12 als Kurvendiagramm dargestellt. Die Fluoreszenz der intravakuolären Struktur ist viel stärker als die der übrigen Vakuolenmembran. Zur quantitativen Bestimmung, wie viel stärker die intravakuoläre Struktur fluoresziert, wurden 22 Strukturen durch Dreipunktbestimmungen ausgewertet und für jede Zelle der Faktor bestimmt, um den die intravakuoläre Struktur stärker leuchtete als die Außenmembran. Die Einstülpungen leuchteten  $3 \pm 0,5$  mal stärker als die übrige Vakuolenmembran.

Durch Expression des Reporterkonstrukts eGFP-FYVE<sub>2</sub> konnte eine höhere PI3P-Konzentration in den Einstülpungen der Vakuolenmembran nachgewiesen werden. Diese Sortierung wird durch Stickstoffmangel verstärkt, wie in 3.3.3.2 gezeigt wurde, ohne dass es jedoch zu einer Hemmung der Mikroautophagocytose kommt (s. 3.3.3.3).

### 3.4 Etablierung eines *in vivo* Nachweises der Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae*

Um auf Proteinebene untersuchen zu können, ob die eGFP-Fluoreszenz, die im Mikroskop zu sehen ist, von dem eGFP-Fusionsprotein stammt oder von einem

Abbauprodukt, wurden Proteinextrakte der Hefekulturen nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen hergestellt und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Das Protein eGFP besitzt eine einzigartige 3D-Struktur, die den Abbau des Fluorophors durch Proteasen erschwert (Cody, Prasher et al. 1993; Ormo, Cubitt et al. 1996). Das heißt, das Fusionsprotein wird vom C-Terminus her abgebaut, bis nur noch der eGFP-Fluorophor übrig ist. Das eGFP-Abbauprodukt wird im Western Blot durch Antikörper gegen GFP noch erkannt.

### 3.4.1 Nach Hungerinduktion findet ein schneller Abbau des membrangebundenen eGFP-FYVE<sub>2</sub> statt.

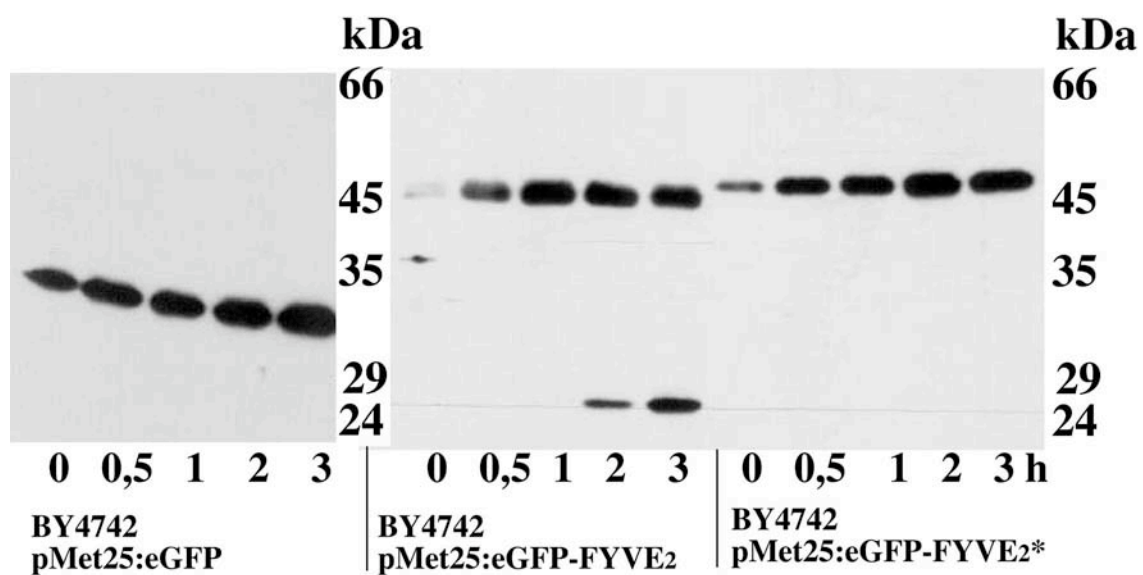


Abb. 3-14: Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in Hefezellen bei Stickstoffmangel. Die Hefezellen transformiert mit eGFP-Expressions-Plasmiden, wurden in Vollmedium angezogen und für 0 bis 3 Stunden (h) in Stickstoffmangelmedium inkubiert. Nach der angegebenen Zeit wurden Proben entnommen, Proteinextrakte angefertigt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die eGFP-Fusionsproteine / -Abbauprodukte im Western Blot mit Anti-GFP-Antikörpern nachgewiesen. Nur bei eGFP-FYVE<sub>2</sub> findet nach 3 Stunden in Stickstoffmangelmedium ein nachweisbarer Abbau des Fusionsproteins statt (Abbauprodukt ca. 26 kDa).

Bei Expression von eGFP, eGFP-FYVE<sub>2</sub> oder eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* unter Kontrolle des Met25-Promotors im Wildtypstamm BY4742 erfolgt durch Stickstoffmangel ein spezifischer Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub>, während eGFP allein oder eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*, die nicht an die Vakuolenmembran binden, nach 3 h Stunden noch nicht abgebaut werden (Abb. 3-14).

### 3.4.2 eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau erfolgt durch vakuoläre Proteasen

In Hefezellen, denen die Proteinase B (Pep4) fehlt, besitzen die Vakuolen nur reduzierte proteolytische Aktivität, da dieses Protein zur Aktivierung vieler Proteasen, Esterasen und Lipasen nötig ist (Jones 2002). Um zu untersuchen ob der proteolytische Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> über das Lumen der Vakuole stattfindet, wurde das Protein ebenfalls in einem  $\Delta$ pep4-Stamm exprimiert und der Abbau auf Proteinebene untersucht.

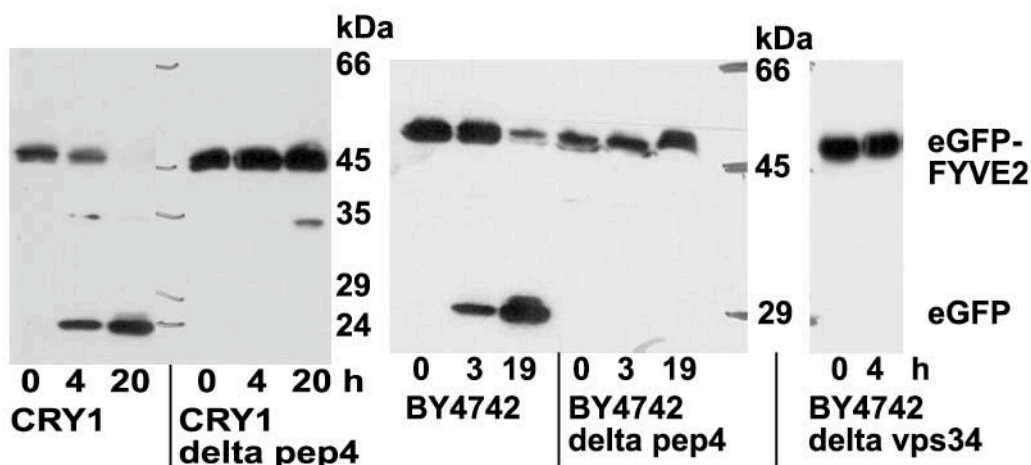


Abb. 3-15: eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau in Protease-negativen Hefestämmen. Es wurden verschiedene Hefestämme mit pGal1:eGFP-FYVE<sub>2</sub> transformiert, in Galactosemedium 0,2 % induziert und anschließend in Stickstoffmangelmedium inkubiert. Bei Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in CRY1 und BY4742 wurde das Fusionsprotein innerhalb von 20 h fast vollständig zu eGFP abgebaut, während in  $\Delta$ pep4 und  $\Delta$ vps34 kein eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau stattfand.

Dieses Experiment wurde mit den beiden Wildtypen CRY1 und BY4742 und zusätzlich mit einem  $\Delta$ vps34-Stamm durchgeführt, bei dem keine Bindung des eGFP-FYVE<sub>2</sub> an die Vakuolenmembran stattfindet (Abb. 3-15). Da die Deletionsmutanten mit dem Met25-Promotor nicht ausreichend Protein exprimieren, wurde das Plasmid mit pGal1:eGFP-FYVE<sub>2</sub> für diese Experimente eingesetzt. In den Wildtypen wurde eGFP-FYVE<sub>2</sub> in 20 Stunden fast vollständig abgebaut, während in den Proteinase-negativen Stämmen und in der  $\Delta$ vps34-Mutante kein Abbau zu beobachten war. Das bedeutet, eGFP-FYVE<sub>2</sub> gelangt unter Stickstoffmangelbedingungen ins Vakuolenlumen und wird dort abgebaut. Bei der  $\Delta$ vps34-Mutante konnte keine Relokalisierung des eGFP-FYVE<sub>2</sub> ins Vakuolenlumen festgestellt werden, auch nach 6 Stunden in Stickstoffmangelmedium lag die Fluoreszenz vollständig cytoplasmatisch vor.

Die Vps34-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 wurden in *in vitro*-Experimenten zur Hemmung der Mikroautophagocytose eingesetzt. Es stellte sich die Frage, ob sie auch *in vivo* den Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> bei Hungerbedingungen verhindern konnten. Deshalb wurden sie den Wildtypzellen, die eGFP-FYVE<sub>2</sub> exprimiert hatten, in Vollmedium vor und während einer Inkubation in Stickstoffmangelmedium zugesetzt. Bei Verwendung des Inhibitors Wortmannin war ein starker eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau zu beobachten, der auch ohne Stickstoffmangelbedingungen durch Zugabe des Inhibitors induziert wurde (Abb. 3.16a). Der Abbau verlief unabhängig von der Autophagocytose. Diese Stimulation des Abbaus durch Wortmannin wurde in ähnlicher Weise beim Abbau von ASOR (Asialo-Orosomucoid) in Leberzellen beobachtet (Mousavi, Brech et al. 2003). Bei der Verwendung des Inhibitors LY294002 wurde diese starke Induktion des Abbaus nicht beobachtet. Um den Einfluss der Inhibitoren auf den Ablauf des eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbaus zu untersuchen, wurde in weiteren Experimenten die Autophagocytose für 1,5 h in Stickstoffmangelmedium induziert, bevor für weitere 1,5 h die Inhibitoren zugesetzt wurden (Abb. 3-16b). Das heißt, bei Zugabe der Inhibitoren war schon etwa 20 % des Abbaus erreicht. In den Zellen mit Wortmannin wurde fast das Kontrollsignal erreicht, während bei Zugabe des Inhibitors LY294002 das Abbausignal nur auf 60 % anstieg. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der Abbau in den Proben mit Wortmannin vor allem auf den Autophagocytose-unabhängigen Effekt zurückzuführen war, wurde dieses Ergebnis für die Beurteilung des eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbaus durch Mikroautophagocytose nicht gewertet. Die Verwendung des zweiten Inhibitors LY294002 zeigte, dass *in vivo* die Mikroautophagocytose durch diesen niedermolekularen Inhibitor zwar reduziert, aber nicht vollständig gehemmt werden konnte.

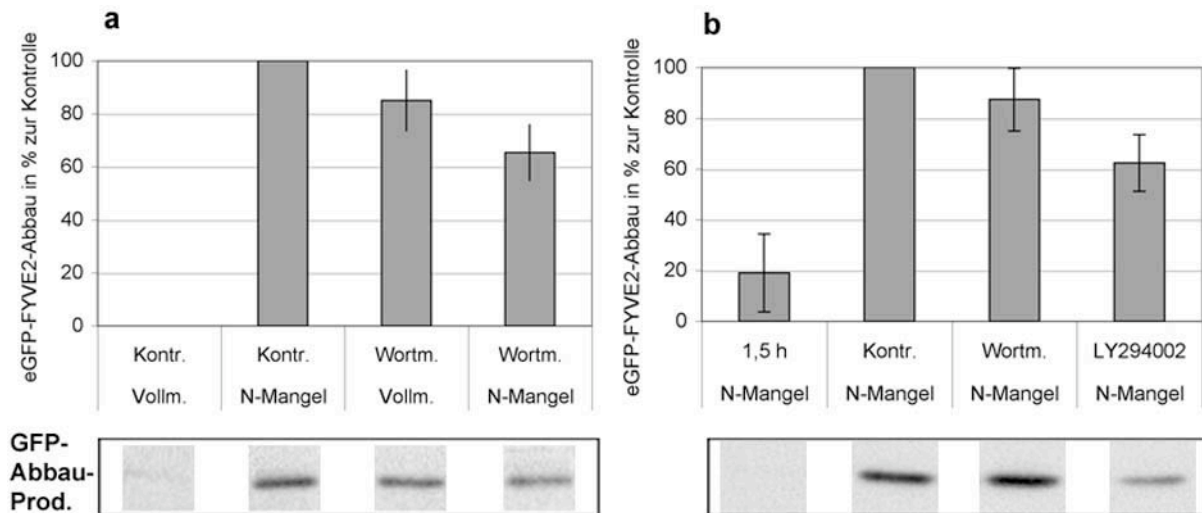


Abb. 3-16: Die Wirkung der Vps34-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 auf den Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> *in vivo*. BY4742 transformiert mit dem Plasmid pGal1:eGFP-FYVE<sub>2</sub> wurde für 2,25 h in Galactosemedium (0,2 %) inkubiert. (a) Die Zellen wurden für 1 h in Vollmedium ohne und mit Wortmannin (0,5 mM) geschüttelt, bevor sie für 3 Stunden in Stickstoffmangelmedium ohne oder mit Wortmannin (0,5 mM) gehungert wurden. Die Inkubation mit Wortmannin bereits in Vollmedium führt in kurzer Zeit zu starkem eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau, während in den Kontrollzellen in Vollmedium noch kein Abbau stattfindet. (b) Die Zellen wurden für 1,5 h in Stickstoffmangelmedium inkubiert, bevor sie für weitere 1,5 h mit den Inhibitoren inkubiert wurden. Nach 1,5 h sind etwa 20 % eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau erreicht. Durch Zusatz des Vps34-Inhibitors LY294002 kann der weitere Abbau reduziert werden.

(Nach Western Blot-Analyse der Hefezellen wurde die Bandenintensität der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbaubanden quantifiziert und die Werte als Balkendiagramm mit Mittelabweichung dargestellt. Beispiele der Banden im Western Blot sind unter den entsprechenden Balken abgebildet; Kontr.: Kontrolle ohne Inhibitor; Vollm.: Vollmedium; Wortm.: Wortmannin 0,5 mM; LY294002: 0,5 mM)

Das Fusionsprotein eGFP-FYVE<sub>2</sub> wird in Protease-negativen Stämmen auch nach langer Hungerphase nicht abgebaut. Befindet es sich noch auf der Oberfläche der Vakuolenmembran, in Vesikeln im Vakuolenlumen oder ist es diffus im Vakuolenlumen verteilt? Um diese Frage zu beantworten, wurde CRY1  $\Delta$ pep4  $\Delta$ prb1 transformiert mit pMet25:eGFP-FYVE<sub>2</sub> lange gehungert und durch konfokale Mikroskopie analysiert (Abb. 3-17). Die Fluoreszenz lokalisierte nach 20 h in Stickstoffmangelmedium zum Teil zur umgebenden Vakuolenmembran, zum Teil zu Vesikeln im Vakuolenlumen. Auch in diesem Protease-negativen Stamm fand eine Einstülpung der Vakuolenmembran und eine Abschnürung von Vesikeln ins Vakuolenlumen statt.

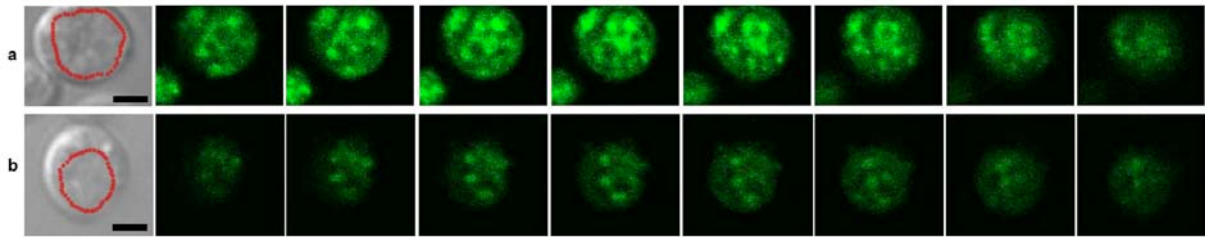


Abb. 3-17: eGFP-FYVE<sub>2</sub>-enthaltende Autophagische Körperchen in Proteinase-negativen Hefen. Konfokale Mikroskopie gehungerter CRY1  $\Delta$ pep4  $\Delta$ prb1-Zellen transformiert mit pMet25:eGFP-FYVE<sub>2</sub> nach 26 h in Stickstoffmangelmedium. Der Umriss des Fluoreszenz-enthaltenden vakuolären Kompartiments ist durch die rote Markierung im Durchlichtbild dargestellt. Mit der Einstellung 1 Airy wurden Bildstapel mit einer vertikalen Distanz von ca. 0,5  $\mu$ m zwischen den einzelnen Bildern aufgenommen. Es sind die Fluoreszenz-Aufnahmen der beiden Zellen gezeigt. Länge des schwarzen Balkens: 2  $\mu$ m.

### 3.4.3 Expression eGFP-FYVE<sub>2</sub> in Hefemutanten

Die oben geschilderten Ergebnisse (3.4.1 und 3.4.2) legen nahe, dass der gezielte Abbau des „membrangebundenen“ eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Proteins als Modell für die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* dienen und *in vivo* als Nachweis für mikroautophagische Aktivität eingesetzt werden könnte.

Um diese Hypothese genauer zu testen, wurden verschiedene Hefedeletionsmutanten im Stammhintergrund BY4742 eingesetzt. Sie wurden mit dem Plasmid pGal1:eGFP-FYVE<sub>2</sub> transformiert und die Proteinsynthese durch Galactose-Induktion herbeigeführt, bevor die Zellen für 3-4 Stunden in Stickstoffmangelmedium inkubiert wurden. Als Kontrolle für makroautophagische Proteinaufnahme in die Vakuole diente das nicht an die Vakuolenmembran bindende Protein eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* im Wildtyp (pGal1:eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*). Bei allen untersuchten Hefestämmen, bis auf die  $\Delta$ vps34-Mutante, konnte eine Bindung des Fusionsproteins eGFP-FYVE<sub>2</sub> an die Vakuolenmembran beobachtet werden. Die Ergebnisse der eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau-Experimente sind in Abbildung 3-18 vergleichend dargestellt. Zur mikroskopischen Untersuchung der Mutanten war der Stammhintergrund BY4742 nicht geeignet, da er selbst mehrere kleine Vakuolen besitzt, bei denen Einstülpungen nur schlecht von aneinander anliegenden Vakuolen unterschieden werden konnten.

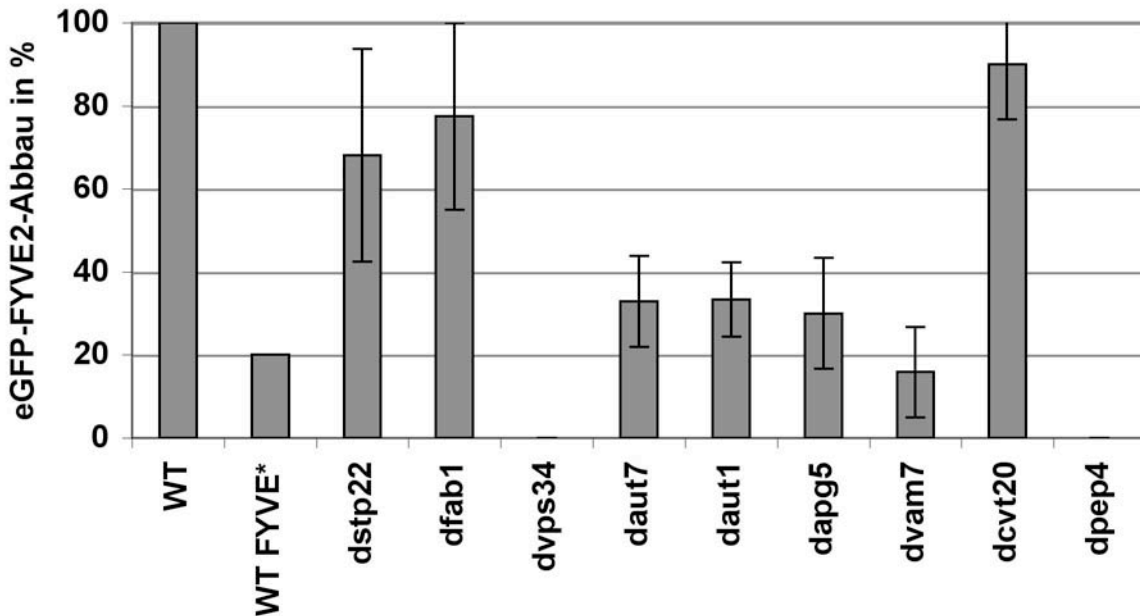


Abb. 3-18: Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> oder eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* (FYVE\*) bei Stickstoffmangel zu eGFP in verschiedenen Deletionsmutanten im BY4742-Hintergrund. Nachgewiesen durch Western Blot in Hefe-Proteinextrakten. Der Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> im Wildtyp BY4742 wurde für jedes Experiment als 100 % gesetzt. Der Abbau von eGFP-FYVE(C215S)<sub>2</sub> durch Makroautophagocytose produzierte nur etwa 1/5 dieses Signals im Western Blot und wurde deshalb mit 20 % bewertet. Die Abbauaktivität der Deletionsmutanten wurde mit diesen Abbausignalen verglichen. Es wurden die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gebildet.

Als Positivkontrolle für den eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau durch Mikroautophagocytose diente der Wildtyp-Stamm BY4742, der unter Kontrolle des Gal1-Promotors eGFP-FYVE<sub>2</sub> exprimiert (WT). Die Induktion erfolgte für 2,5 bis 4,5 Stunden in Galactose-Medium (0,2 %). Anschließend wurden die Zellen für 3-4 Stunden in Stickstoffmangelmedium inkubiert. Nach dieser Zeit waren ca. 50 % der durch die Galactose-Induktion synthetisierten Fusionsproteine abgebaut. Diese Abbauaktivität wurde als 100 % gewertet (Abb. 3-18). Um festzustellen, welche Proteinmenge durch Makroautophagocytose in die Vakuole gelangte, wurde eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* unter gleichen Bedingungen exprimiert (WT FYVE\*). Während der nachfolgenden Inkubation in Stickstoffmangelmedium wurde ca. 10 % des Fusionsproteins abgebaut. Das Erscheinen dieses schwachen Abbauprodukts entspricht also 20 % des Signals für das Wildtyp-Protein. Dieser Abbau ist vermutlich auf den makroautophagischen Proteintransport und die mikroautophagische Cytosol-Aufnahme in die Vakuole zurückzuführen. Im Gegensatz dazu fand in Protease-negativen Stämmen ( $\Delta$ pep4) keinerlei Abbau statt.

Die Mutante  $\Delta$ stp22 wurde für diese Abbau-Experimente eingesetzt (Abb. 3-18, vgl. 3.2.1). Sie zeigte verglichen mit dem Wildtyp etwa 70 % mikroautophagischen Membran-Abbau. Die hier beobachtete Aktivität lag weit über der Protein-Abbaurate, die durch Makroautophagocytose im Wildtyp (WT FYVE\*) erreicht wurde. Der reduzierte mikroautophagische Abbau könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie einen „vacuolar protein sorting“-Defekt aufweist (STP22 = VPS23) und deshalb nur eine reduzierte Ausstattung an vakuolären Proteinen in der Vakuole vorhanden ist. Bei einer Analyse des Proteingehalts isolierter Vakuolen lagen vakuoläre Markerproteine in geringerer Menge als in Wildtyp-Vakuolen vor (ALP ca. 50 %, Vam3 ca. 25 %; nicht gezeigt). Ein weiterer Hefestamm mit einem schweren Vakuolendefekt ist die  $\Delta$ vam7-Mutante. Bei einer Analyse des Proteingehalts isolierter Vakuolen lagen die vakuolären Markerproteine zum Teil als inaktive Vorstufen (CPY zu 20 %, ALP zu ca. 50 %) und in geringerer Menge als in Wildtyp-Vakuolen vor (nicht gezeigt). Das Protein Vam7 bindet unter anderem über seine PI3P-bindende PX-Domäne an die Oberfläche der Vakuole (Cheever, Sato et al. 2001). Die Zellen der  $\Delta$ vam7-Deletionsmutante bauen ca. 0-20 % des eGFP-FYVE<sub>2</sub> bei Stickstoffmangel ab, sind also teilweise zu mikroautophagischem Membranabbau fähig (Abb. 3-18). Hier zeigt sich, dass die Ausstattung der Hefe-Vakuole essentiell ist für vollen eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau.

Auch die Mutanten im PI3P-Stoffwechselweg,  $\Delta$ vps34 und  $\Delta$ fab1, wurden untersucht. Der  $\Delta$ vps34-Stamm, bei dem eGFP-FYVE<sub>2</sub> nicht an die Vakuolenmembran bindet, zeigte keinerlei Abbau (Abb. 3-18, vgl. 3.4.2). Die  $\Delta$ fab1-Mutante besaß fast Wildtyp-Aktivität. Trotz der Größe der Vakuolen (Abb. 3-3) wird unter Stickstoffmangelbedingungen Membranmaterial durch Mikroautophagocytose abgebaut. PI3P ist essentiell für den mikroautophagischen Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub>, während PI(3,5)P<sub>2</sub> dabei keine Rolle spielt.

Zusätzlich wurden drei Deletionsmutanten für an der Makroautophagocytose beteiligte Proteine untersucht ( $\Delta$ aut7,  $\Delta$ aut1,  $\Delta$ apg5; Abb. 3-18). Sie sind an der Bildung der Autophagosomen im Cytosol beteiligt (2.3). Diese Vesikel sind nötig für den makroautophagischen Proteintransport zur Vakuole. In diesen Mutanten ist ein eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau zu beobachten, der ca. 20-40 % der Wildtypkontrolle entspricht. Bei Expression des eGFP-FYVE<sub>2</sub>\* war unter den gleichen Bedingungen kein Abbau



zu beobachten (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Mikroautophagocytose unabhängig von den Autophagosomen-abhängigen Vorgängen erfolgt, dass aber der stete Membranfluss zur Vakuole durch makroautophagische Vesikel nötig ist, um Material für die Mikroautophagocytose zu liefern.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Makroautophagocytose-Mutanten war bei der Deletionsmutante  $\Delta$ cvt20, die einen Defekt im Transport der Aminopeptidase I vom Cytosol ins Vakuolenlumen aufweist, keine Reduktion des mikroautophagischen eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbaus zu beobachten. Dieses PI3P-bindende Protein ist nicht essentiell für die Mikroautophagocytose.

Die Beurteilung des mikroautophagischen Abbaus von eGFP-FYVE<sub>2</sub> durch Hefedeletionsmutanten erlaubt eine eindeutige Zuordnung der Mutante, sofern diese Wildtyp-Aktivität aufweist. Bei einer reduzierten mikroautophagischen Aktivität muss die Ausstattung der Vakuole mit Proteasen zur Beurteilung hinzugezogen werden, da ein spezifischer Defekt der Mikroautophagocytose nur bei ausreichender Protease-Aktivität vorliegt. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen eignet sich der durch Stickstoffmangel induzierte eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau als *in vivo* Assay für die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae*.

### **3.5 Ist das Protein Stp22 aktiv an der Mikroautophagocytose beteiligt?**

Die Deletionsmutante  $\Delta$ stp22 wurde in Bezug auf ihre Aktivität in der Mikroautophagocytose charakterisiert. Dazu wurden verschiedene *in vivo* und *in vitro* Techniken eingesetzt (3.1, 3.2). Zusätzlich wurde der in dieser Arbeit entwickelte *in vivo* Assay für Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* eingesetzt (3.4). Da diese unterschiedlichen Experimente widersprüchliche Ergebnisse lieferten, wurde die potentielle Beteiligung des „class E“ Proteins Stp22 durch weitere Experimente untersucht.

Bei *in vitro* Experimenten mit Vakuolen der Deletionsmutante  $\Delta$ stp22 zeigten diese eine aktive Protonenpump-Leistung, nahmen aber keine Luciferase auf, was den Voraussetzungen für eine Mutante in der Mikroautophagocytose entspricht (3.2).

Dahingegen wiesen sie bei *in vivo* Experimenten zur Mikroautophagocytose (3.4) eine deutlich höhere Aktivität auf als eine  $\Delta$ vam7- oder  $\Delta$ vps34-Mutante. Diese Ergebnisse deuteten daraufhin, dass die Ausstattung der Hefevakuolen für die Luciferase-Aufnahme *in vitro* unzureichend war, während die Vakuolen im zellulären Umfeld zum mikroautophagischen Membranabbau fähig waren.

Ein weiterer Ansatz zur Beurteilung der Frage, ob das „class E“-Protein Stp22 aktiv an der Mikroautophagocytose beteiligt ist, war der Einsatz spezifischer Inhibitoren im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay. Stp22p wurde als Teil des ESCRT-I-Komplexes charakterisiert, der an der Proteinsortierung am „Multivesicular Body“ beteiligt ist (Babst, Odorizzi et al. 2000; Reggiori and Pelham 2001; Katzmann, Babst et al. 2001). Während dieser Sortierung erfolgt die Abspaltung von Ubiquitin von den Proteinen, die ins Lumen des „Multivesicular Body“ gelangen und für das Lumen der Vakuole bestimmt sind. Diese Abspaltung erfolgt in Abhängigkeit von der Ubiquitin-Isopeptidase Doa4p. Zwei Inhibitoren, die de-ubiquitinierende Enzyme hemmen, oder einzelne Ubiquitin-Reste abspalten, wurden im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt. Ubiquitin Aldehyd, ein Inhibitor der Ubiquitin C-terminalen Hydrolasen, wurde in Konzentrationen bis 10  $\mu$ M, die Ubiquitin C-terminale Hydrolase (UCH-L3) in Konzentrationen bis 1  $\mu$ M verwendet. Die Proben wurden 10 min auf Eis beziehungsweise 10 min ohne ATP vorinkubiert, damit die Inhibitoren wirken konnten, bevor die Luciferase-Aufnahme-Reaktion durch Umsetzen auf 27 °C oder durch Zugabe von ATP gestartet wurde. Die Herstellerangaben zur vollen Inhibierung von Ubiquitin-C-Terminalen Hydrolasen *in vitro* durch Ubiquitin-Aldehyd lagen bei 2-5  $\mu$ M, für die Substrathydrolyse durch die Ubiquitin C-terminale Hydrolase UCH-L3 waren Konzentrationen von 0,05 bis 5 nM angegeben. Keiner dieser Inhibitoren hatte einen Einfluss auf die *in vitro* Luciferase-Aufnahme der Wildtypvakuolen. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine direkte Beteiligung der Deubiquitierungsfunktion des ESCRT-I-Komplexes an der Mikroautophagocytose.

Um wirklich beurteilen zu können, ob Stp22 oder weitere „class E“-Proteine (als Beispiel Vps4) direkt an der mikroautophagischen Einstülpung der Vakuolenmembran beteiligt sind, wurde ihre Lokalisierung *in vivo* untersucht. Dazu wurden sie in Expressionsvektoren mit CFP fusioniert und in Hefen mikroskopisch untersucht.

Zur Überprüfung der Funktionalität der Fusionsproteine wurden die für diesen Zweck konstruierten Plasmide pGal1:CFP-Stp22 und pGal1:CFP-Vps4 in die entsprechenden Deletionsmutanten im BY4742-Hintergrund transformiert. Die „class E“-Mutanten  $\Delta$ stp22 und  $\Delta$ vps4 zeichnen sich bei einer FM4-64-Färbung durch den sogenannten class E-Phänotyp aus. Sie besitzen eine einzelne, etwas größere, schwächer gefärbte Vakuole mit stärker fluoreszierenden Bereichen am Rand der Vakuole, das so genannte „class E“-Kompartiment, das vermutlich einen degenerierten „Multivesicular Body“ darstellt (vgl. Abb. 3-1 und 3-2). Der Wildtyp-Hefestamm hingegen enthält 1-3 kleinere Vakuolen. Vergleichend wurden der Wildtyp und die Deletionsmutanten mit und ohne Expressions-Plasmide mit FM4-64 gefärbt. Zur Induktion der CFP-Fusionsproteine wurden sie in Galactosemedium (0,05 %) angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 4 h in Vollmedium kultiviert und für 2-3 h in Stickstoffmangelmedium mit FM4-64 gefärbt. Nur durch die lange Erholungsphase in Vollmedium war eine eindeutige Zuordnung der Vakuolenmorphologie als Wildtyp- oder „class E“-Phänotyp möglich. Bei einem Großteil der  $\Delta$ stp22-Zellen konnte durch Expression des CFP-Fusionsproteins der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden (nicht gezeigt). Allerdings wurde bei Expression von CFP-stp22 viel weniger Protein synthetisiert als bei Expression von CFP allein oder von CFP-vps4, wie durch mikroskopische Untersuchungen und durch Western Blot Analysen nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Durch Expression des CFP-Vps4 war keine „Rettung“ des  $\Delta$ vps4-Phänotyps möglich (nicht gezeigt). Beide Konstrukte wurden für Expressionsexperimente in CRY1 eingesetzt.

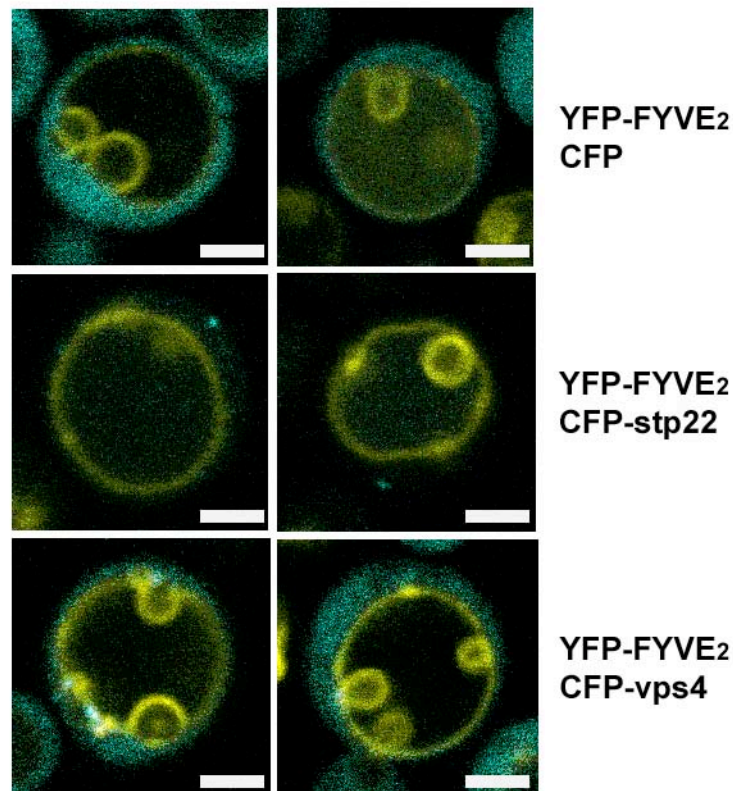


Abb. 3-19: Coexpression von YFP-FYVE<sub>2</sub> (gelbe Fluoreszenz) und CFP, CFP-stp22 oder CFP-vps4 (blaue Fluoreszenz) im Wildtyp-Hefestamm CRY1. Nach einer Vorkultur in Vollmedium wurde die Proteinsynthese durch Wachstum in YP-Gal 0,2 % für 7 h induziert. Anschließend konnten sich die Zellen für 2,5 h in Vollmedium erholen, bevor sie 1,5 h in Stickstoffmangelmedium geschüttelt und im Konfokalen Mikroskop analysiert wurden. Länge des weißen Balkens: 2 µm.

Der Mikroskopierstamm CRY1 wurde mit den Expressionsplasmiden für YFP-FYVE<sub>2</sub> und die CFP-Proteine transformiert. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen wie in Abbildung 3-19 beschrieben wurde die Lokalisierung der Fusionsproteine in Bezug zur YFP-gefärbten Vakuolenmembran beurteilt. CFP allein wird in großer Menge produziert und ist gleichmäßig im Cytosol verteilt. CFP-stp22 wird in viel geringerem Ausmaß synthetisiert. Es lokalisiert zu kleinen punktförmigen Bereichen im Cytosol. Bei der Analyse der Zellen durch Konfokale Mikroskopie konnten 1-5 der CFP-Stp22 haltigen Strukturen pro Zelle detektiert werden. Der Durchmesser dieser Strukturen betrug weniger als 1 µm, da sie nur selten in zwei aufeinander folgenden optischen Schnitten mit einem Abstand von 0,5 µm beobachtet wurden. Diese punktförmigen Strukturen lokalisierten nicht zur Vakuolenmembran.

Bei Expression des Fusionsproteins CFP-Vps4 lag ein Großteil des Proteins cytosolisch vor. An der YFP-FYVE<sub>2</sub>-gefärbten Vakuolenmembran lokalisierten einzelne stärker fluoreszierende punktförmige Strukturen, die dem „class E“-

Kompartiment entsprechen könnten. Möglicherweise wurde durch Expression eines inaktiven Vps4 eine „class E“-Mutante erzeugt.

### **3.6 Ausblick: Mikroautophagocytose als Lipid-vermittelter Prozess**

Bei der Untersuchung verschiedenster Hefemutanten mit *in vitro* und *in vivo*-Techniken konnte kein eindeutig an der Mikroautophagocytose beteiligtes Protein identifiziert werden. Allerdings wurden in den Kapiteln 3-2 bis 3-4 stichhaltige Hinweise dafür geliefert, dass das Lipid PI3P an der Mikroautophagocytose beteiligt ist und über diesen Weg in die Vakuole gelangt. Hierbei stellt sich die Frage, welche weiteren Lipide bei der Mikroautophagocytose eine tragende Rolle spielen. Im Folgenden wird ein zusätzliches Experiment gezeigt, das Hinweise auf die Beteiligung des Lipids Diacylglycerin an der Mikroautophagocytose liefert. Diese Beobachtung muss allerdings noch durch weiterführende Experimente bestätigt werden.

#### **Extraktion der Vakuolen mit Lipid-Komplexbildnern**

Cyclodextrine werden als Komplexbildner für Lipide eingesetzt, um diese in Wasser löslich zu machen (Produktinformationen Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D).  $\beta$ -Cyclodextrin wurde verwendet, um Diacylglycerol aus Insekten-Lipoproteinen hoher Dichte durch Solubilisierung zu isolieren (Jouni, Zamora et al. 2000), Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin wurde verwendet, um Cholesterol in Mikrosomenmembranen einzubringen (Härtel, Diehl et al. 1998). Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin inkorporiert neben Cholesterol auch Ergocalciferol, Linoleinsäure, Ölsäure und Retinol. Die Extraktion durch Cyclodextrine erfolgt am effektivsten bei 4 °C (Jouni, Zamora et al. 2000).

Isolierte Hefevakuolen wurden mit  $\beta$ -Cyclodextrin und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin in verschiedenen Konzentrationen vorbehandelt. Die Vakuolen wurden nach der Extraktion durch Flotieren in einem Dichtegradienten reisoliert. Falls diese durch die Extraktionsbedingungen lysiert wurden und so umgebenden Puffer höherer Dichte aufgenommen haben, sollten sie nicht mehr in der Lage sein, im Dichtegradienten zu flotieren. Die reisolierten Vakuolen wurden in einem Standard-Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt (Abb. 3-20). Durch Vorbehandlung der Vakuolen mit 7,5 mM  $\beta$ -

Cyclodextrin konnte die Luciferase-Aufnahme der Vakuolen auf 30 % verglichen mit der Kontrolle reduziert werden, während die Behandlung mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin darauf keinen Einfluss hatte.

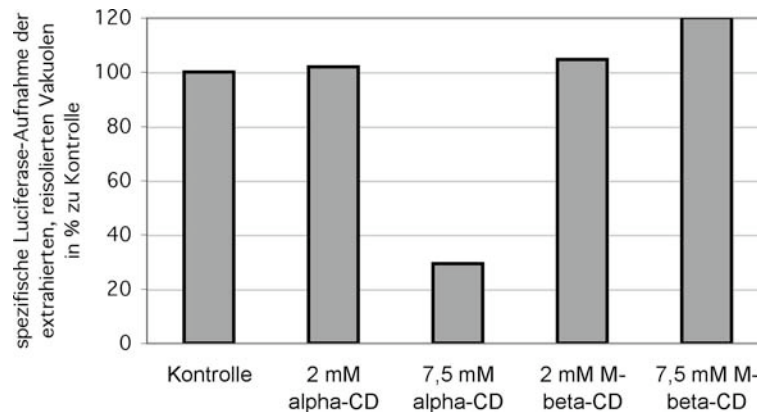


Abb. 3-20: Extraktion mit 7,5 mM  $\alpha$ -Cyclodextrin (alpha-CD) reduziert die Luciferase-Aufnahme reisolierter Vakuolen, während die Vorinkubation mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M-beta-CD) darauf keinen Einfluss hat. Isolierte Vakuolen wurden bei 4 °C mit oder ohne den angegebenen Konzentrationen an Cyclodextrinen behandelt und durch Flotieren in einem Ficoll-Gradienten reisoliert. Danach wurden sie in einem Standard-Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt. Die spezifische Luciferase-Aufnahme in Prozent bezogen auf die Vakuolen ohne Cyclodextrinbehandlung (Kontrolle). Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

In Hefezellen sind verschiedene Synthesewege für Diacylglycerol bekannt (Vance and Vance 2002). Diacylglycerol stellt einen der Botenstoffe dar, die durch die Reaktion der Phospholipase C aus Phosphatidylinositol-(4,5)-Bis-Phosphat erzeugt werden. Außerdem wird das Lipid durch Phosphatidat-Phosphatasen und als Nebenprodukt der Sphingolipid-Synthese gebildet. Es wurden zwei Inhibitoren beschrieben, die durch Hemmung der Diacylglycerol-Synthese einen Einfluss haben auf die Vesikelbildung beim Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Fumonisin B1 hemmt die Ceramid-Synthese bei einer Konz. von 25  $\mu$ g/ml, Propanolol inhibiert Phosphatidat-Phosphatasen bei einer Konz. von 0,5 mM (Baron and Malhotra 2002)). Möglicherweise spielt die Diacylglycerolsynthese auch während der Mikroautophagozytose eine Rolle. Aus diesem Grund wurde der Inhibitor Fumonisin B1 im *in vitro* Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt. Er hatte bis 2 mM (1,5 mg/ml) keinen Einfluss auf die mikroautophagische Aktivität. Propanolol wurde nicht getestet.

An der Vakuole spielen möglicherweise andere Enzyme, wie zum Beispiel die Phospholipase C1, eine größere Rolle was die Diacylglycerolsynthese angeht. Es

wurden bereits verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die einen Einfluss auf Phospholipasen haben (Edelfosine, U73122, Manoalid, (Kunz 2002)), aufgrund ihrer lytischen Wirkungen konnte keine klare Aussage bezüglich einer spezifischen Hemmung der Mikroautophagocytose getroffen werden.

Die spezifische Reduktion der mikroautophagischen Aktivität durch eine Behandlung mit  $\beta$ -Cyclodextrin gibt erste Hinweise auf die Beteiligung von Diacylglycerol an der Einstülpung der Vakuolenmembran durch Stickstoffmangelbedingungen.

## 4 Diskussion

Bei der Mikroautophagocytose, wie sie von (Muller, Sattler et al. 2000) und (Sattler and Mayer 2000) beschrieben wurde, handelt es sich um einen einzigartigen membranvermittelten Prozess, der bislang nur in Säugerzellen auf morphologischer Basis beschrieben wurde (Seglen and Bohley 1992). Durch eine direkte Einstülpung der Membran kommt es zum Transport von cytosolischem und Lipid-haltigem Material ins Lumen des lytischen Organells. Die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen charakterisierten mikroautophagischen Einstülpungen (Muller, Sattler et al. 2000) zeichnen sich durch einen schmalen Autophagischen Schlauch aus, an dessen Ende Vesikel ins Vakuolenlumen abgeschnürt werden. Bei Stickstoffmangel erfolgt durch Makroautophagocytose ein Transport von Cytosol zur Vakuole. Durch diesen Vesikel-vermittelten Prozess findet eine Zunahme der Vakuolenoberfläche statt. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei der Mikroautophagocytose um einen Protein-vermittelten Prozess handelt oder um einen Vorgang, der allein durch Lipide vorangetrieben wird. Auch die Beteiligung sowohl bestimmter Proteine als auch einiger Lipide an der Bildung autophagischer Einstülpungen ist möglich. Bislang wurden noch keine direkten Proteinkomponenten identifiziert, während in dieser Arbeit die Beteiligung eines speziellen Lipids an der Mikroautophagocytose gezeigt werden konnte.

### 4.1 Wie wird die Größe einer Hefevakuole reguliert?

Durch die verschiedenen Vesikel-vermittelten Transportwege erfolgt ein ständiger Membranfluss zur Vakuole (2.2), während nur ein Beispiel für die Rückgewinnung von Membranmaterial aus der Vakuole bekannt ist (Bryant, Piper et al. 1998). Viele Hefe-Wildtypstämme besitzen eine bis drei Vakuolen, die die Form einer Kugel aufweisen. Unter der Annahme, dass die Transport-Vesikel ebenfalls kugelförmig sind mit einem Volumen, das ca. 1 % des Vakuolenlumens entspricht, vergrößert sich die Oberfläche der Vakuole nach der Fusion mit 10 Vesikeln um 50 %, während das Volumen lediglich um 10 % zunimmt. Unter dem Elektronenmikroskop betrachtet haben die dabei entstehenden Strukturen die Form einer ungleichen Acht. Trotz eines Vesikel-Flusses durch MVB-Vesikel und Autophagosomen bleibt die Form und



das Verhältnis von Vakuolenlumen zu Zelllumen auch nach 4 Stunden in Stickstoffmangelmedium konstant. In PMSF-behandelten Zellen kommt es unter diesen Bedingungen zur Anreicherung von Autophagischen Körperchen im Vakuolenlumen, wodurch der geregelte Zufluss von Vesikeln gezeigt werden kann (Muller, Sattler et al. 2000). Diese Anreicherung ist in Wildtypzellen nicht zu beobachten, obwohl die gleiche Anzahl an Autophagosomen die Vakuole erreicht. Bei der Untersuchung von cryofixierten Wildtyp-Hefezellen können nur selten Autophagische Körperchen oder ein Querschnitt durch einen Autophagischen Schlauch im Vakuolenlumen gezeigt werden (3.3.2). Das bedeutet, dass der Ausgleich von aufgenommenem Membranmaterial durch proteolytischen Abbau sehr schnell erfolgen muss. Nach 3-4 Stunden in Mangelmedium sind alle Vakuolen von Protease-defizienten Wildtypzellen mit Autophagischen Körperchen gefüllt (Tsukada and Ohsumi 1993), ohne dass sich die Gesamt-Oberfläche der Hefevakuole entsprechend vergrößert. Es stellt sich die Frage, wie die Regulation dieses Membranausgleichs erfolgt und woran die Zelle erkennt, dass Vakuolenmembran durch Mikroautophagozytose abgebaut werden muss.

Die Phosphatidylinositol-3-Phosphat-5-Kinase Fab1 nimmt direkten Einfluss auf die Größe der Hefe-Vakuole. Bei Ausfall dieses Protein vergrößert sich die Vakuole und ist schlechter acidifiziert, während eine Hyperaktivität zur Fragmentierung der Vakuole führt (Bonangelino, Nau et al. 2002). Durch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Vergrößerung der Vakuole in dieser Mutante nicht auf einen Defekt in der Mikroautophagozytose zurückzuführen ist.

Ein weiteres Protein des Phosphatidylinositol-Stoffwechsels, die Phosphatidylinositol-3-Kinase Vps34, ist für die Mikroautophagozytose essentiell. Vps34 konnte als Bestandteil zweier Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Dabei spielt der eine Komplex bei der Sortierung am „Multivesicular Body“ (MVB), der andere bei der Makroautophagozytose eine Rolle (Kihara, Noda et al. 2001). In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass 90 % des PI3P in Inneren Strukturen des MVB lokalisiert (Gillooly, Morrow et al. 2000). Die Dichte an internen Membranen im MVB ist sehr hoch, so dass nach Fusion mit der Vakuole deren Oberfläche in Bezug auf die aufgenommene Membranmenge nur wenig wächst. Im Gegensatz dazu findet durch Makroautophagozytose ein höherer Membranfluss statt. Die äußere Membran der Autophagosomen fusioniert mit der Vakuolenmembran und vergrößert deren

Oberfläche, während die Autophagischen Körperchen direkt ins Vakuolenlumen transportiert werden. Der an der Makroautophagocytose beteiligte Vps34-Komplex lokalisiert zur Prä-Autophagosomalen Struktur (PAS), von der aus die Autophagosomen und „cvt-Vesikel“ gebildet werden (Suzuki, Kirisako et al. 2001; Kim, Huang et al. 2002). Der Abbau des Lipids PI3P in Abhängigkeit von luminalen Proteasen wurde bereits gezeigt (Wurmser and Emr 1998).

In dieser Arbeit konnte durch Kombination verschiedener *in vitro* und *in vivo* Techniken in *S.cerevisiae* gezeigt werden, dass PI3P für die Mikroautophagocytose essentiell ist. Die Inkubation der Hefezellen unter Stickstoffmangelbedingungen induziert die Bildung Autophagischer Schläuche. Durch die Bildung Autophagischer Körperchen an autophagischen Einstülpungen gelangt das Lipid ins Vakuolenlumen, wo es abgebaut wird. Die Affinitätsmarkierung mit GST-FYVE<sub>2</sub> auf Kunststoffschnitten wies in diesen Schläuchen eine erhöhte Konzentration an PI3P nach. Auch die Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in *S.cerevisiae* zeigte eine laterale Sortierung des Lipids bei Stickstoffmangel. Dies wurde durch Einsatz der PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 *in vitro* bestätigt, welche die mikroautophagische Substrat-Aufnahme ins Lumen der isolierten Vakuolen verhinderten. Auch die Blockierung des vorhandenen Lipids durch die Lipid-Binde-Domänen konnte die Aufnahme des Substrats verhindern. Die Deletionsmutante  $\Delta$ vps34 zeigte *in vitro* keine mikroautophagische Aktivität und bildete *in vivo* keine Autophagischen Schläuche. Bei Einsatz der Inhibitoren Wortmannin und LY294002 in ganzen Zellen konnte die Bildung Autophagischer Schläuche reduziert werden. Eine Zunahme der PI3P-Konzentration auf der Oberfläche der Vakuolenmembran durch vesikuläre Transportvorgänge könnte als Signal für die Rekrutierung spezieller mikroautophagischer Proteine dienen oder direkt durch seine molekularen Eigenschaften eine Einstülpung der Vakuolenmembran auslösen.

Mit Hilfe kinetischer Untersuchungen konnte die inhibitorische Wirkung von LY294002 und der PX-Domäne einer späten Phase der *in vitro* Mikroautophagocytose zugeordnet werden. In Abb. 4-1 ist ein Stufenschema der Mikroautophagocytose vorgeschlagen, wie es aus den Ergebnissen dieser Arbeit sowie nach (Kunz 2002) und (Sattler and Mayer 2000) hergeleitet wurde. In einem frühen Schritt kommt es in Abhängigkeit von einer Situation des Stickstoffmangels

zur Induktion der Bildung Autophagischer Schläuche. Dieser frühe Schritt kann durch die Inhibitoren GTP $\gamma$ S, Nystatin und Aristolochiasäure verhindert werden. Für die Abschnürung der mikroautophagischen Körperchen ist das Lipid PI3P essentiell. Die mögliche Beteiligung weiterer Lipide wie z.B. Diacylglycerin (DAG) muss noch detailliert untersucht werden. Dieser Schritt kann durch verschiedene Inhibitoren, die zum Beispiel das Membranpotential und PI3P auf der Vakuolenoberfläche beeinflussen, verhindert werden (FCCP / Valinomycin, Rapamycin, K252a, Concanamycin A, LY294002, PX-Domäne). Proteasen und Lipasen verdauen anschließend die durch Mikroautophagocytose aufgenommenen Cytosol- und Membranbestandteile. Die Zugabe von Proteasehemmern wie PMSF oder Pefabloc reduziert diesen letzten Schritt.

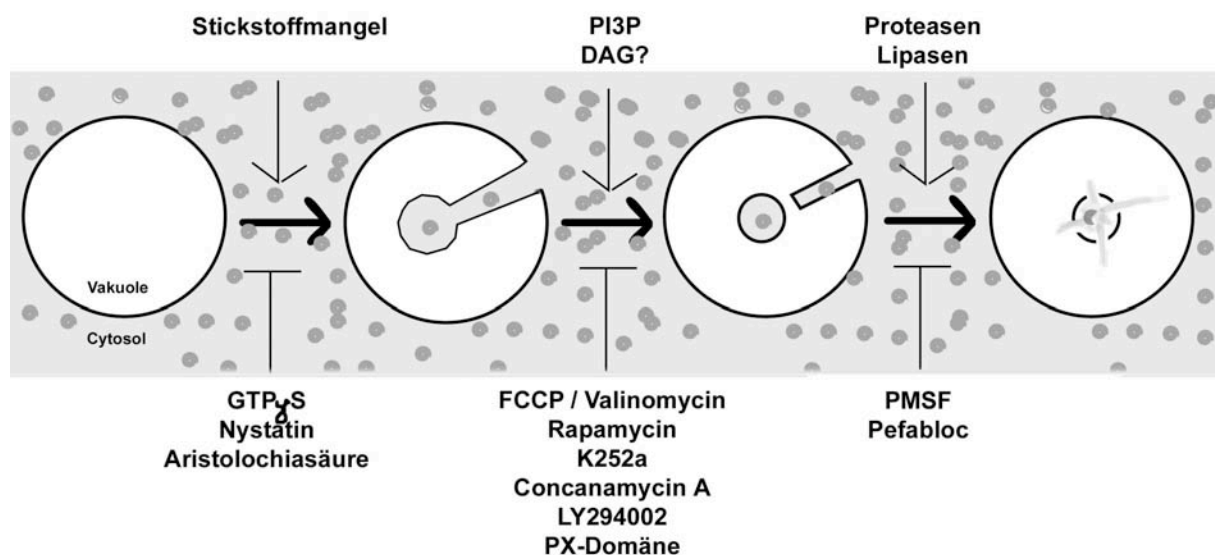


Abb. 4-1: Stufenschema der Mikroautophagocytose – *in vitro* gewonnen aus kinetischen Untersuchungen. In der frühen Phase kommt es durch die Induktion unter Stickstoffmangel zur Bildung der mikroautophagischen Einstülpungen. Es folgt die vom Membranpotential sowie von Phosphatidylinositol-3-Phosphat abhängige Abschnürung des mikroautophagischen Vesikels. Die Beteiligung weiterer Lipide wie Diacylglycerin (DAG) müssen zusätzliche Untersuchungen noch bestätigen. Anschließend erfolgt der Verdau des Vesikels samt Inhalt durch Lipasen und Proteasen. Die einzelnen Schritte können mit Hilfe der unter dem Schema angegebenen Inhibitoren verhindert werden (nach (Sattler and Mayer 2000), (Kunz 2002) und dieser Arbeit).

Ob die Bildung der Autophagischen Schläuche während des durch GTP $\gamma$ S inhibierten Schrittes erfolgt oder während einer späteren Phase ist nicht geklärt. Die Wirkung der späten Inhibitoren konnte durch zusätzliche Experimente in (Kunz, Schwarz et al. 2003) weiter aufgeteilt werden. Der Transfer auf Eis stoppte die Reaktion in einem Stadium vor der Wirkung der Inhibitoren FCCP / Valinomycin. Es wurde die so

genannte „schnelle Aufnahme“ beschrieben. Bei Zugabe der Luciferase 2 min vor Ende der Inkubationszeit bei 27 °C wurde ein Aufnahmesignal von 40 % erreicht verglichen mit einer 100 % Aufnahme, wenn die Luciferase während 60 min mit den isolierten Vakuolen inkubiert worden war. Bei gleichzeitiger Zugabe von Inhibitor und Luciferase wurde die „schnelle Aufnahme“ durch K252a und Rapamycin noch beeinflusst, während FCCP / Valinomycin keine Wirkung mehr zeigte. Die späte Hemmung wurde also zusätzlich in drei Phasen unterteilt. Diese Aufteilung wurde in der hier vorgelegten Arbeit nicht untersucht.

## **4.2 Etablierung eines *in vivo*-Assay für Mikro- und Makroautophagocytose**

Bislang konnte kein spezifisches Substrat für die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* identifiziert werden. Daher wurde postuliert, dass unspezifisch Cytosol und Membranmaterial durch Einstülpung der Vakuolenmembran aufgenommen wird (Muller, Sattler et al. 2000; Sattler and Mayer 2000).

Die Expression von GFP-Fusionsproteinen erlaubte es, die Mikro- und Makroautophagocytose in Hefe getrennt zu verfolgen. Das cytosolisch lokalisierende eGFP-FYVE(C215S)<sub>2</sub> diente als Substrat für den unspezifischen Transport von Cytosol ins Vakuolenlumen durch Autophagosomen. Unter Stickstoffmangelbedingungen wird der Marker durch vakuoläre Proteasen abgebaut. Die Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> führte zur Lokalisierung des Proteins auf der Vakuolenmembran und lieferte somit ein potentielles Substrat für die Mikroautophagocytose. Eine Inkubation in Stickstoffmangelmedium induzierte den Abbau des Proteins durch vakuoläre Proteasen, wie Experimente mit einer Proteinase A-negativen Mutante bestätigten. Die direkte Einstülpung der Membran, wie sie mit Hilfe konfokaler Mikroskopie gezeigt werden konnte, führte zum Transport des Proteins von der cytosolischen Seite der Membran ins Lumen der Vakuole. Bei dem hier beobachteten spezifischen Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> handelt es sich folglich um Mikroautophagocytose. Die Bindung der Proteindomäne an das Lipid erfolgt aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen, so dass ein Gleichgewicht zwischen gebundener und nicht-gebundener Form besteht. Die Umverteilung des Lipidbindenden Proteins durch Assoziation und Dissoziation kann die lokale

Konzentration des Lipids in der Vakuolenmembran widerspiegeln. Dies wurde hier für eGFP-FYVE<sub>2</sub> unter Stickstoffmangelbedingungen gezeigt. Die Bindung an das Lipid ist allerdings so fest, dass bei Inkubation der Hefezellen mit Wortmannin oder LY294002 keine Relokalisierung der Domäne ins Cytosol zu beobachten war. Auch wenn die Inhibitoren bereits während der Galactose-induzierten Expression des Proteins zugegeben wurden, lokalisierte das Protein zur Vakuolenmembran, was belegt, dass trotz Hemmung der PI3-Kinase noch ausreichend PI3P synthetisiert wurde oder vorhanden war (nicht gezeigt).

Die Inhibitoren Wortmannin und LY294002 wurden eingesetzt, um den eGFP-FYVE<sub>2</sub>- und eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*-Abbau in vivo zu untersuchen. Beide Inhibitoren führten bei einer Inkubation von 4 Stunden zu einer Reduktion des makroautophagischen eGFP-FYVE<sub>2</sub>\*-Abbaus um etwa 50 % (nicht gezeigt). Die Vps34-Funktion ist auch für die Bildung der Autophagosomen in der Makroautophagocytose essentiell (Blommaart, Krause et al. 1997; Petiot, Ogier-Denis et al. 2000; Wurmser and Emr 2002). Im Gegensatz dazu wurde bei Einsatz von Wortmannin ein von der Autophagocytose unabhängiger schneller Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> beobachtet. In Vollmedium war nach einer Stunde mit Inhibitor ein Abbau erreicht, wie er in Stickstoffmangelmedium ohne Inhibitor erst nach drei Stunden festzustellen war. Der Inhibitor LY294002 führte in Vollmedium nicht zu einem verstärkten Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub>. Auch bei Zugabe während der gesamten Inkubation in Stickstoffmangelmedium konnte keine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. Der Haupt-Abbau des eGFP-FYVE<sub>2</sub> erfolgte in der Zeitspanne von 1,5 bis 3 Stunden nach Beginn der Stickstoffmangelphase. Bei Zugabe des Inhibitors LY294002 nach 1,5 Stunden konnte die starke Zunahme des Abbausignals um 50 % reduziert werden. Dies deutet auf einen direkten Einfluss der PI3-Kinase auf den Abbau des membrangebundenen eGFP-FYVE<sub>2</sub> hin. Ein ähnliches Phänomen wie beim Einsatz des Inhibitors Wortmannin wurde bei Untersuchung der Endocytose und des Abbaus eines Liganden in Hepatocyten beobachtet (Mousavi, Brech et al. 2003). Bei Zusatz von Wortmannin und LY294002 veränderten die späten endocytischen Kompartimente ihre Struktur. Sie vergrößerten sich und wiesen eine geringere Dichte auf als in unbehandelten Zellen. Auch die Verteilung der lytischen Marker änderte sich, so dass der Abbau des Ligands in den neuen Kompartimenten geringerer Dichte erfolgte. Diese Rückverteilung der späten endocytischen Komponenten zu

früheren Kompartimenten führte zu einem von der Autophagocytose unabhängigen Abbau von Membrankomponenten. Dieser Effekt überlagert bei längerem Zusatz der Inhibitoren eine mögliche Reduktion der Mikroautophagocytose, wie sie die kürzere Zugabe von LY294002 zeigt.

Durch Untersuchung der Deletionsmutanten für Vps34 konnte gezeigt werden, dass ohne PI3P keine Mikroautophagocytose möglich war. Die Vakuolen waren *in vitro* inaktiv und bildeten *in vivo* keine Autophagischen Schläuche. Auch nach sehr langer Inkubation unter Stickstoffmangel (20 h) war kein Abbau des Reporterproteins eGFP-FYVE<sub>2</sub> nachzuweisen. Es sollte allerdings darauf hingewiesen werden, dass der Marker in der Mutante nicht zur Vakuole lokalisiert, da diese kein PI3P enthält. Er stellt deswegen ein Substrat für Makroautophagocytose dar.

### 4.3 Mikroautophagocytose $\neq$ Makroautophagocytose

Um zu klären, ob der durch Stickstoffmangel induzierte eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau von Komponenten der Makroautophagocytose abhängt, wurden Deletionsmutanten für die Proteine Aut1, Aut7 und Apg5 für diese Experimente eingesetzt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten sie einen reduzierten eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau von ca. 20-40 %. Bei Untersuchung des eGFP-FYVE(C215S)<sub>2</sub>-Abbaus durch Makroautophagocytose wurde keine Aktivität nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Vakuolen der  $\Delta$ aut1-,  $\Delta$ aut7- und  $\Delta$ apg5-Zellen im *in vitro* Mikroautophagocytose-Assay zeigten Wildtyp-Aktivität, während das Cytosol der Deletionsmutanten nur etwa 50 % der Aufnahmekapazität vermittelte (Sattler and Mayer 2000). Für die mikroautophagische Aktivität scheinen diese Proteine *in vitro* also nur eine indirekte Rolle zu spielen. Diese Ergebnisse wurden durch die hier beschriebenen Experimente bestätigt. Die Bildung von Autophagosomen und ihr Transport zur Vakuole unter Mangelbedingungen ist also nicht essentiell für die Mikroautophagocytose. Die Reduktion der Aktivität in den Deletionsmutanten gibt einen Hinweis darauf, dass der stete Membranfluss zur Vakuole durch Makroautophagocytose notwendig ist, um die weitere Bildung Autophagischer Schläuche zu induzieren. Dies würde die geringere Anzahl Autophagischer Schläuche in diesen Mutanten erklären (Sattler and Mayer 2000). Alternativ würde die Bildung von sehr kleinen Autophagischen Schläuchen in den Mutanten zum einen die geringere Anzahl detektierter Einstülpungen und zum

anderen den geringeren eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau erklären, da weniger Material aufgenommen wird. Die Makroautophagocytose-Mutanten zeichnen sich dadurch aus, dass sie trotz einer Proteinase A-Deletion unter Stickstoffmangel keine Autophagischen Körperchen im Vakuolenlumen anreichern (Tsukada and Ohsumi 1993), was die Hypothese unterstützt, dass in den Mutanten auch weniger Autophagische Schläuche gebildet werden.

Die Lokalisierung des Vps34-Komplexes, der für die Bildung von Autophagosomen essentiell ist, wurde durch Expression von YFP-Apg14 untersucht (Kim, Huang et al. 2002). Es wurde eine schwache Färbung der Vakuolenmembran sowie eine perivakuoläre punktförmige Fluoreszenz detektiert. In einer Deletionsmutante für Apg14 war keine Lokalisierung von Aut7 und Apg5 zu diesem perivakuolären Kompartiment festzustellen. Auch wurde gezeigt, dass der für die Autophagocytose essentielle Vps34-Komplex eine geringere Kinase-Aktivität besitzt, als der MVB-assoziierte Komplex (Kihara, Noda et al. 2001). Die Bildung der „Präautophagosomalen Struktur“ (PAS) ist abhängig von dem Vps34-Komplex, ob die Kinase auch für die Reifung der Autophagosomen nötig ist, bleibt unklar. Sollte während der Reifung der Autophagosomen PI3P synthetisiert werden, besteht die Möglichkeit, dass das Lipid auf der inneren Membran der Autophagosomen gebildet wird. Auf der inneren Membran lokalisiertes Lipid könnte freies eGFP-FYVE<sub>2</sub> binden und mit ins Vakuolenlumen transportieren. Das könnte den schnellen Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> durch Makroautophagocytose allein erklären. Gegen diese Hypothese spricht, dass zu Beginn der Stickstoffmangelbedingungen eGFP-FYVE<sub>2</sub> vor allem auf der Oberfläche der Vakuolen lokalisiert (3.3.3.2). Bei Verwendung des Gal1-Promotors für diese Experimente findet während der Stickstoffmangelphase keine weitere Synthese des Markers statt, so dass eine Rückverteilung des Markers ins Cytosol und anschließend eine Bindung an die Autophagosomen stattfinden müsste. Bei Zusatz der Vps34-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 in Vollmedium wurde keine Rückverteilung des eGFP-FYVE<sub>2</sub> ins Cytosol beobachtet (nicht gezeigt), was für eine fast irreversible Bindung an die Vakuole spricht. Es sollte also nicht zu einer Neu-Bindung an die während des Stickstoffmangels im Cytosol gebildeten naszierenden Autophagosomen-Membranen kommen. Die in den Makroautophagocytose-Mutanten festgestellte Abbauaktivität von 40 % läuft unabhängig von der Autophagosomenbildung ab. Ob sich die zusätzlichen 60 %

Aktivität im Wildtyp durch Abbau von Autophagosomen-gebundenem eGFP-FYVE<sub>2</sub> statt durch Aufnahme über Autophagische Schläuche allein ergibt, kann hier aber nicht ausgeschlossen werden.

Unter der Annahme, dass der hier beobachtete eGFP-FYVE<sub>2</sub>-Abbau auf Mikroautophagocytose allein zurückzuführen ist, bietet der in dieser Arbeit etablierte *in vivo* Assay für Mikroautophagocytose erstmals die Möglichkeit, den mikro- und makroautophagischen Proteinabbau in ganzen Hefezellen getrennt zu untersuchen.

#### **4.4 Mikroautophagocytose $\neq$ MVB-Einstülpung**

Über die Proteinsortierung am „Multivesicular Body“ (MVB) ist in Bezug auf die beteiligten Proteinkomponenten bereits sehr viel bekannt. Die primäre Funktion von PI3P wurde als Signalmolekül am frühen Endosom oder am „Multivesicular body“ beschrieben, wo es bei der Proteinsortierung beziehungsweise für die Lokalisierung bestimmter Proteine zu diesem Kompartiment essentiell ist (Stenmark, Aasland et al. 2002; Simonsen, Wurmser et al. 2001; Gillooly, Simonsen et al. 2001). In BHK-Säugerzellen zeigten frühe und späte Endosomen (MVB) die höchste spezifische Konzentration an PI3P (Gillooly, Morrow et al. 2000). Dabei war 90 % des Lipids auf internen Membranen des MVB nachzuweisen. In Wildtyphefzellen kann PI3P vor allem in der Vakuole nachgewiesen werden. In „class E“-Mutanten wurde ein vergrößertes Prevakuoläres Kompartiment ohne interne Vesikel detektiert, welches den Großteil des Lipids enthält (Gillooly, Morrow et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde in der hier beschriebenen Arbeit PI3P wie oben beschrieben auf der Oberfläche der Vakuole und zusätzlich auf mikroautophagischen Einstülpungen im Vakuolenlumen von *S.cerevisiae* detektiert. Dieses Ergebnis korreliert mit der Funktion des Lipids bei der Bildung der Einstülpungen.

Stp22/Vps23 wurde als eines von 17 „class E“-Endocytose-Proteinen identifiziert (Katz, Ferguson et al. 1987; Raymond, Howald-Stevenson et al. 1992). Die Vakuole der „class E“-Mutanten enthält zwar die Alkalische Phosphatase (ALP), die vATPase sowie viele der vakuolären Proteine lokalisieren aber vor allem zu dem übergroßen „class E“-Kompartiment. Das Protein Stp22/Vps23 ist Bestandteil des ESCRT-I-Komplexes (endosomal sorting complex required for transport) (Katzmann, Babst et al. 2001). Rezeptoren oder Transportproteine der Plasmamembran, die für den



Abbau bestimmt sind, werden durch einzelne Ubiquitin-Reste markiert und werden so zum Substrat für die Endocytose und die nachfolgende Sortierung ins Vakuolenlumen (Horak 2003; Raiborg, Rusten et al. 2003; Katzmann, Odorizzi et al. 2002). Die „class E“-Proteine sind an der Sortierung und Einstülpung von Proteinen ins Lumen des MVB beteiligt. Da wie bei der Mikroautophagocytose eine Sortierung von Membranen ins Innere eines Organells erfolgt, stellte sich die Frage, ob die „class E“-Proteine auch an der Mikroautophagocytose beteiligt sind.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Screens nach Mikroautophagocytose-Mutanten und der *in vitro* Experimente mit  $\Delta$ stp22-Hefen deuteten daraufhin, dass „class E“-Proteine eine Rolle für die Mikroautophagocytose spielen. In zusätzlichen Experimenten mit Inhibitoren, welche die Sortierung am MVB stören sollten, konnte jedoch kein Effekt auf die *in vitro* Mikroautophagocytose nachgewiesen werden. Zudem lokalisierte ein funktionelles CFP-Stp22 Fusionsprotein nicht zu mikroautophagischen Einstülpungen der Vakuolenmembran. Auch dieser Befund spricht gegen eine direkte Beteiligung des „class E“-Proteins an der Mikroautophagocytose. Die Deletionsmutante  $\Delta$ stp22 wurde auch durch Einsatz des *in vivo* Mikroautophagocytose-Assays charakterisiert. Beim Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> unter Stickstoffmangel-Bedingungen zeigten die Zellen nahezu Wildtyp-Aktivität (80 %). Der geringere Abbau könnte im Biogenese-Defekt und der reduzierten Protease-Ausstattung begründet liegen. Die Zellen der  $\Delta$ stp22-Mutante zeigten also *in vivo* mikroautophagische Aktivität.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo*-Experimenten vergleichbar sind. Die Rekonstitution eines biologischen Prozesses *in vitro* erlaubt die Kontrolle verschiedener Parameter im experimentellen System, verfälscht aber auch Ergebnisse, da es sich um ein künstliches System handelt. Die Vakuolen aus Deletionsmutanten können zum Beispiel anfälliger sein gegenüber mechanischem Stress als die Vakuolen von Wildtyphefen, so dass sie falsch-negative Ergebnisse liefern können. Die Wirkung von Inhibitoren kann *in vitro* auch stärker sein als *in vivo*, da die Möglichkeiten zur Entgiftung oder zur Neusynthese von Proteinen nicht gegeben sind. Bei *in vivo* Experimenten hingegen ist das untersuchte Organell eingebettet ins Cytoskelett, der rege vesikuläre Membranfluss findet statt (soweit das für die einzelne Deletionsmutante möglich ist) und auch die

Konzentration an cytosolischen Proteinen ist *in vivo* zehn mal höher als *in vitro*. Dabei kann wiederum das Problem auftreten, dass der untersuchte Effekt von anderen Vorgängen in den Zellen überdeckt werden kann, wie es hier für den Einsatz des Inhibitors Wortmannin beim Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> *in vivo* gezeigt wurde.

Bei einer FM4-64-Färbung konnten in der  $\Delta$ stp22-Mutante keine Autophagischen Schläuche detektiert werden, während durch den *in vivo* Mikroautophagocytose-Test (Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub>) gezeigt wurde, dass das „class E“-Protein Stp22 für den mikroautophagischen Abbau zellulärer Komponenten nicht essentiell ist. Für diese Diskrepanz der Ergebnisse *in vivo* gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Die Quantifizierung der Autophagischen Schläuche durch eine FM4-64-Färbung bewertet nur die Zellen mit einer einzelnen großen Vakuole, da die Bildung von autophagischen Einstülpungen in Zellen mit mehreren kleinen Vakuolen nicht sichtbar wird. Das könnte bedeuten, dass der mikroautophagische Abbau in „class E“-Mutanten vor allem in den Zellen mit kleineren Vakuolen erfolgt oder die Mutante kleinere Schläuche als der Wildtyp bildet. Diese kleineren Schläuche könnten durch die FM4-64-Färbung nicht sichtbar gemacht werden. Durch zusätzliche Experimente mit Inhibitoren und Expression eines CFP-Stp22-Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass sich die mikroautophagischen Einstülpungen der Hefevakuole unabhängig von Komponenten der MVB-Sortierung bilden. In Anbetracht der hier dargestellten widersprüchlichen Ergebnisse wird deutlich, dass *in vitro*-Daten stets durch unabhängige Experimente bestätigt werden sollten. Der *in vivo* Mikroautophagocytose-Assay erlaubte es, die Mikroautophagocytose in ganzen Zellen zu detektieren und zeigte in Kombination mit anderen Experimenten, dass die mikroautophagische Einstülpung an der Vakuole unabhängig von Komponenten der Sortierung am MVB abläuft.

#### **4.5 Ist PI3P direkt oder indirekt an der Mikroautophagocytose beteiligt?**

Das Lipid PI3P gehört zu den in geringster Konzentration vorliegenden Phosphatidylinositolen. In Säugerzellen stellt Phosphatidylinositol die Hauptspezies dar. Ca. 5-10 % des vorhandenen Phosphatidylinositols ist an Position vier

phosphoryliert (PI4P, PI4,5P<sub>2</sub> in gleichen Mengen) und nur etwa 0,5 % liegt als PI3P vor (Vanhaesebroeck, Leever et al. 2001). PI3P lokalisiert ausschließlich zu späten endocytischen Kompartimenten und zur Vakuole (Zinser, Sperka-Gottlieb et al. 1991) (Gillooly, Morrow et al. 2000). Die Hauptaufgabe des PI3P in der Mikroautophagocytose könnte darin bestehen, Effektormoleküle zur Vakuolenmembran zu rekrutieren. Diese Effektoren würden dann die Einstülpung der Membran vermitteln. Andererseits könnte das Lipid auch allein durch seine molekularen Eigenschaften eine Einstülpung der Membran nach Innen auslösen (Abb. 4-2).

In Hefe sind 5 FYVE-Proteine bekannt (Fab1, Pep7/Vac1/Vps19, Pib1, Pib2 und Vps27). Für die Lokalisierung der Proteine *MmEEA1* und *ScPib1* ist die FYVE-Domäne essentiell (Stenmark, Aasland et al. 1996; Burd and Emr 1998), während die Lokalisierung von *MmHrs* und *ScVac1* unabhängig von PI3P oder der intakten FYVE-Domäne ist (Komada, Masaki et al. 1997; Burd, Peterson et al. 1997). Die *ScFYVE*-Proteine und die FYVE-Domäne von *MmEEA1* wurden bereits als GFP-Fusionsproteine kloniert, in Hefe exprimiert und nach ihrer Lokalisierung und ihren Bindeeigenschaften untersucht (Burd and Emr 1998). Für Pib1 wurde die Lokalisierung zu punktförmigen Strukturen im Cytosol gezeigt, während die übrigen vier *ScFYVE*-Proteine zusätzlich an der Vakuolenmembran detektiert wurden. Die punktförmigen Strukturen im Cytosol wurden als prävakuoläre Endosomen identifiziert, da bei einer FM4-64-Färbung der Farbstoff diese Kompartimente auf dem Weg zur Vakuole durchläuft. In dieser Arbeit wurde hingegen die Lokalisierung von eGFP-FYVE<sub>2</sub> in Abhängigkeit von Stickstoffmangel untersucht. Durch konfokale Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die hier beobachteten stärker fluoreszierenden Strukturen im Vakuolenlumen zu finden waren. In Abhängigkeit von der Gesamt-Fluoreszenzintensität der Zelle zeigten diese Einstülpungen / Vesikel eine drei mal höhere Fluoreszenz als die äußere Vakuolenmembran. In einem Proteinase-negativen Stamm konnten nach einer Hungerinduktion fluoreszierende Vesikel im Vakuolenlumen beobachtet werden, was belegt, dass der Transport ins Vakuolenlumen durch eine Einstülpung der Vakuolenmembran und die Abschnürung von Vesikeln ins Vakuolenlumen erfolgt.

Neben den 5 FYVE-Proteinen gibt es in *S.cerevisiae* 15 Proteine, die eine PX-Domäne enthalten und somit an PI3P binden können (Stenmark, Aasland et al.

2002). Dazu gehören die Proteine Vam7, Bem1, Bem3, Vps17, Vps5, die „Sorting Nexine“ und die Phospholipase D (Wishart, Taylor et al. 2001). All diese Proteine stellen putative Interaktoren von PI3P in Zusammenhang mit der Mikroautophagocytose dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Deletionsmutanten für PI3P-bindende Proteine untersucht. Dazu gehörten  $\Delta$ fab1,  $\Delta$ cvt20 und  $\Delta$ vam7.  $\Delta$ fab1 und  $\Delta$ cvt20 zeigten keinen Defekt in der Mikroautophagocytose. Diese Proteine beziehungsweise der Transportweg, in dem sie aktiv sind, ist nicht essentiell für die mikroautophagische Aktivität der Hefevakuole. Die  $\Delta$ vam7-Mutante zeigte zwar eine Reduktion der Aktivität (20-40 %), es sollte jedoch bedacht werden, dass das Protein auch bei der Biogenese der Vakuole eine wichtige Rolle spielt (Raymond, Howald-Stevenson et al. 1992; Wada and Anraku 1992). Durch Verwendung von Antikörpern gegen Vam7 und andere Komponenten der Fusionsmaschinerie konnte *in vitro* gezeigt werden, dass diese für die Mikroautophagocytose nicht essentiell sind (Sattler and Mayer 2000).

Die Untersuchung weiterer Deletions- oder Temperatursensitiver Mutanten PI3P-bindender Proteine in Bezug auf ihre mikroautophagische Aktivität könnte Auskunft geben, ob eines dieser Proteine direkt an der Bildung autophagischer Einstülpungen beteiligt ist oder ob es sich bei dem hier beobachteten Phänomen um einen rein Lipid-vermittelten Prozess handelt. Der hier entwickelte *in vivo* Assay für Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* ermöglicht eine Beurteilung der mikroautophagischen Aktivität, die unabhängig ist von der Vakuolenmorphologie und der Größe der Autophagischen Schläuche der Deletionsmutanten.

## 4.6 Lipide und ihre Eigenschaften in Membranen

Phosphatidylinositol, wie auch die meisten anderen Phospholipide, besitzt eine zylindrische Form in Membranen. Dagegen weisen Phosphatidylethanolamin einen konischen und Lysophospholipide sowie Detergentien einen invers-konischen Umriss auf (Dowhan and Bogdanov 2002). Ein Modell der Bildung Autophagischer Schläuche ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Formen der sich an bestimmten Bereichen bevorzugt einlagernden Lipide sind schematisch dargestellt.

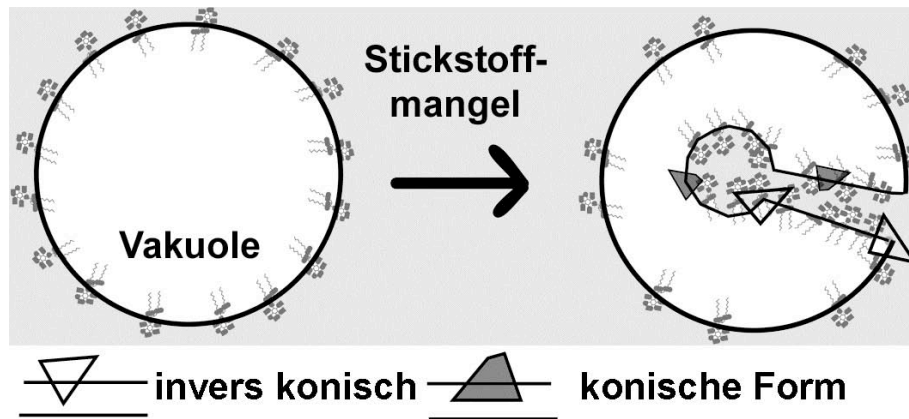


Abb. 4-2: Modell der Bildung Autophagischer Schläuche. Stickstoffmangelbedingungen führen in der Vakuolenmembran zu einer lateralen Sortierung der Lipide. Durch lokale Anreicherung von PI3P bilden sich autophagische Einstülpungen. Invers konische Lipide lokalisieren aufgrund der höheren Krümmung bevorzugt am Übergang von Vakuolenmembran zum Schlauch und am Übergang vom Schlauch zum sich bildenden Vesikel. Konische Lipide passen sich in die Krümmung im Schlauch und im sich bildenden Vesikel ein.

Durch Phosphorylierung des Phosphatidylinositols an Position 3 des Inositolrings benötigt die Kopfgruppe des Phospholipids mehr Platz und die Form des Lipids könnte sich von zylindrisch nach invers-konisch verschieben. Das würde bedeuten, das Lipid müsste vor allem in den Bereichen starker konvexer Membrankrümmung vorkommen, da die invers-konische Form diese Krümmung begünstigt. Diese Verteilung ist auf Kunststoffschnitten für die Elektronenmikroskopie nicht zu beobachten. Das Lipid ist gleichmäßig über die mikroautophagische Einstülpung verteilt. Eine alternative Erklärung für die besonderen Eigenschaften des Lipids liegt in der zusätzlichen negativen Ladung begründet. Beispiele hierfür sind die Lipide Phosphatidat und Cardiolipin, deren Form sich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung von zylindrisch nach konisch ändert (Dowhan and Bogdanov 2002). Für Phosphatidylinositol bedeutet dies, dass es nach Phosphorylierung an Position 3 durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine konische Form annehmen könnte. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen an die zusätzliche Phosphat-Gruppe könnte sich zudem auf die Packung der Lipide in der Membran auswirken, so dass diese dichter liegen und Proteine ausgeschlossen werden. Bei Fusion von Vesikeln mit der Vakuole durch Makroautophagocytose wächst die Oberfläche der Vakuole stärker als ihr Volumen. Es kommt zur selektiven Einstülpung von Bereichen, die keine Proteine enthalten und somit nicht mit dem Cytosol verankert sind. PI3P könnte so die Bildung der Einstülpungen vermitteln. Durch *in vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, dass Liposomen mit dem Lipid Lysobisphosphatidat (LBPA), das in „Multivesicular Bodies“ angereichert ist, in

Abhängigkeit von einem pH-Gradienten über die Membran spontan interne Vesikel bilden (Matsuo, Chevallier et al. 2004). Diese Ergebnisse stützen das Modell, wonach PI3P in ähnlicher Weise zur Bildung von autophagischen Einstülpungen führt.

Beim vesikulären Transport vom Golgi-Apparat zur Cytoplasmamembran spielt die Bildung von DAG eine wichtige Rolle (Weigert, Silletta et al. 1999; Baron and Malhotra 2002), die in der starken „Spaltungsaktivität“ des DAG durch seine konische Form begründet liegt (Kozlov 2002). In der hier vorgelegten Arbeit wurden zusätzlich Hinweise auf die Beteiligung des Lipids DAG an der Mikroautophagocytose gewonnen. Ob DAG selbst oder die enzymatische Bildung dieses Lipids für die Mikroautophagocytose essentiell ist, muss allerdings in weiterführenden Experimenten endgültig geklärt werden. Die Ausbildung Autophagischer Schläuche könnte durch eine Kombination konischer und invers-konischer Lipide wie in Abbildung 4-2 dargestellt erklärbar sein. DAG stellt ein konisches Lipid dar, während Phosphatidylinositol zylindrisch ist und durch die Phosphorylierung seine Eigenschaften verändert hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine essentielle Rolle des Lipids PI3P für den mikroautophagischen Membranabbau nahe. Da auch bei Untersuchung verschiedener Transportwege zur Vakuole keine Proteine identifiziert werden konnten, die spezifisch für die Mikroautophagocytose notwendig sind, scheint die Mikroautophagocytose nicht von traditionellen Transportmaschinerien abhängig zu sein. Zusätzlich zum Vps34-Komplex wurden bei der Suche nach essentiellen Komponenten der Makroautophagocytose keine PI3P-bindenden Proteine identifiziert. Die Zugabe des Lipids bei der *in vitro* Mikroautophagocytose-Aufnahme-Reaktion führte nicht zu einer Reduktion der Aktivität. Dies untermauert eine direkte Wirkung des Lipids bei der Bildung autophagischer Einstülpungen. Wären PI3P-bindende Proteine an der Ausbildung der Autophagischen Schläuche beteiligt, so sollten diese durch den Zusatz von PI3P von der Bindung an die Vakuole abgehalten werden, was zu einer Inhibierung führen müsste. Die Vakuolenmembran stellt die Membran mit dem geringsten Proteinanteil in Zellen dar (Zinser, Sperka-Gottlieb et al. 1991), so dass die besonderen Eigenschaften von Lipiden stärker zum Tragen kommen können. Die Voraussetzungen für einen Lipid-vermittelten Prozess sind hier vorhanden, so dass durch die Deformation der Membran die Bildung der

Einstülpungen und die Abschnürung von Vesikeln durch Lipide vermittelt werden könnte. Die in diesem Abschnitt beschriebenen besonderen Eigenschaften des Lipids PI3P stärken die Hypothese, dass die Mikroautophagocytose in *S.cerevisiae* den ersten rein Lipid-vermittelten Membranprozess darstellt.

## 4.7 Ausblick

Der in dieser Arbeit entwickelte *in vivo* Mikroautophagocytose-Assay kann für die Charakterisierung von Hefe-Deletionsmutanten eingesetzt werden. Von besonderem Interesse sind dabei Stämme, denen PI3P-bindende Proteine fehlen. Um die Beteiligung weiterer Lipide an der Bildung autophagischer Einstülpungen zu untersuchen, können entsprechende Lipid-Bindedomänen wie die FYVE-Domäne in dieser Arbeit als GFP-Fusionsproteine in Hefe exprimiert und ihre Lokalisierung in Abhängigkeit von Stickstoffmangelbedingungen verfolgt werden.

Eine weitere Möglichkeit, Hinweise auf die Zusammensetzung mikroautophagischer Vesikel zu erhalten, stellt der Einsatz eines Proteinase-negativen Hefestamms dar, der nach Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> über längere Zeit unter Stickstoffmangelbedingungen kultiviert wurde. Aus einem Aufschluss dieser Hefezellen könnten durch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) spezifisch mikroautophagische Körperchen isoliert und in Bezug auf ihre Lipid- und Proteinzusammensetzung charakterisiert werden.

Durch Untersuchung von unter Stickstoffmangel gehaltenen murinen Leberzellen in Bezug auf die Lokalisierung von PI3P zu mikroautophagischen Einstülpungen könnte geklärt werden, ob der hier beschriebene Prozess in Säugerzellen konserviert ist.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Hefe- und Bakterienstämme

Die Hefestämme, die für die mikroskopischen Screens (3-1) verwendet wurden, sind in den Listen 1 und 2 im Anhang aufgezählt, alle weiteren sind in Tabelle 5-1 aufgelistet. Dauerkulturen wurden als Glycerinstocks (15 % (v/v)) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Vor Durchführung der Experimente wurden die Hefezellen auf Agarplatten frisch ausgestrichen. Die Lagerung erfolgte maximal 2-4 Wochen auf Platte oder in der Vorkultur bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $\Delta$ vps34-Zellen wurden ausschließlich bei RT gelagert.

Tabelle 5-1: Hefestämme (*S.cerevisiae*, haploid, Nr. AM in Stammsammlung A. Mayer, BW in Stammsammlung von W. Wickner, CD in Stammsammlung C. Dangelmayr)

Nr.	Name	Herkunft	Bemerkungen, Genotyp
AM18	K91-1A	B. Wickner von Y. Kaneko	defizient an löslichen alkalischen Phosphatasen; MATa; pho8::pAL134; pho13::pPH13 lys1
BW370	fab1-2	Koshland	672-5-2; MATa; fab1-2; his3; leu2; ura3; gal1
BW371	$\Delta$ fab1	Koshland	663D1-3 large col.; MAT $\Delta$ ; fab1- $\Delta$ 1; his7; leu2; ura3; gal1
BW372	FAB1	Koshland	4506-9-4; MATa; his3; leu2; ura3; gal1
AM27	BJ3505	A. Haas, D. Gallwitz	MATa; pep4::HIS3; prb1- $\Delta$ 1.6R; lys2-208; trp1- $\Delta$ 101; ura3-52; gal2; can
AM101	CRY1	T. Davis	Mikroskopierstamm; MATa; ade2-1oc; can1-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1
CD47	BMA64-1A	EUROSCARF	Abkömmling des WT-Stammes W303: Nr. 20000A; MATa; ura3-52; trp1 $\Delta$ 2; leu2-3_112; his3-11; ade2-1; can1-100
CD48	BY4742	EUROSCARF	Abkömmling des WT-Stammes S288C: Nr. Y10000; MAT $\Delta$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0
CD101	CRY1 $\Delta$ pep4	diese Arbeit	MATa; ade2-1oc; can1-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; pep4::LEU2 (mit pTS17)
CD343	BY4742 $\Delta$ stp22	EUROSCARF	Y13416: BY4742; MAT $\Delta$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YCL008c::kanMX4



CD351	BY4742 □vma11	EUROSCARF	Y11058: BY4742; MAT□; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; YPL234c::kanMX4
CD428	BY4742 □pep4	diese Arbeit	MAT□; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; pep4::LEU2 (mit pTS17)
CD480	BY4742 □fab1	EUROSCARF	Y17080: BY4742; Mat□; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; YFR019w::kanMX4
CD485	BY4742 □vps34	EUROSCARF	Y15149: BY4742; Mat □; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; YLR240w::kanMX4
CD509	BY4742 □vps4	EUROSCARF	Y15588: BY4742 MAT□; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0 YPR173c::kanMX4
CD541	CRY1 □vps34	diese Arbeit	MATa; ade2-1oc; can1-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; vps34::kan
CD575	BY4742 □aut7	EUROSCARF	BY4742; MAT□; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; YBL078c::kanMX4
CD577	BY4742 □vam7	EUROSCARF	BY4742; MAT□; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; YGL212w::kanMX4
CD578	BY4742 □cvt20	EUROSCARF	BY4742; MAT alpha; his3□1; leu2□0; lys2□0; ura3□0; YDL113c::kanMX4
CD656	CRY1 □pep4 □prb1	diese Arbeit	MATa; ade2-1oc; can1-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; pep4::LEU2; prb1::TRP1

*E.coli* Top10F wurde zur Klonierung und Vervielfältigung von Plasmiden eingesetzt (Genotyp: F<sup>-</sup> {*lacI*<sup>q</sup>, Tn10(Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* □(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) □80*lacZ*□M15 □*lacX74 recA1 deoR araD139* □(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*).

*E.coli* BI21 (DE3) ermöglichte die Expression von Proteinen unter Kontrolle des T7-Promotors nach Zugabe von IPTG, das die Synthese der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors induziert. Die Proteasen Lon und OmpT fehlen (Genotyp: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3)).

*E.coli* BI21 Rosetta (DE3) ermöglichte wie BI21 die Expression von Proteinen unter Kontrolle des T7-Promotors. Zusätzlich trägt dieser Stamm das Plasmid pRARE, das für sechs seltene tRNAs kodiert und die Chloramphenicol-Resistenz trägt. Es erleichtert die Expression von Proteinen, deren Gene in *E.coli* selten vorkommende Codons beinhalten.

## 5.1.2 Chemikalien und Reagenzien, Medien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, in Analyse-Qualität von Roth (Karlsruhe, D), Sigma (Taufkirchen, D) oder Merck (Darmstadt, D) bezogen. Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert (Puffer mit eingestelltem pH-Wert, Aminosäuren, Imidazol; Sterilfilter Nr. SCGPT05RE, Millipore, Bedford, USA). Für genetische und molekularbiologische Techniken wurden sterilisierte Pipettenspitzen, Polyethylen- und Glasgefäße verwendet. Experimente mit gereinigten Proteinen oder *in vitro* Techniken wurden in silikonisierten PE-1,5 ml-Einmalgefäßen durchgeführt.

### 5.1.2.1 Antikörper

Anti-ALP-Antikörper (Maus, A-6458, Molecular Probes, Europe BV, Leiden, NL) 1/50-1/100 für Western blot. Der Antikörper gelöst in Milchpulver (5 % in PBS) kann nicht eingefroren werden. Er erkennt die *S.cerevisiae* Alkalische Phosphatase, ein Markerprotein der Hefevakuole, ca. 70 kDa.

Purified Anti-GFP (Kaninchen, TP401, Torrey Pines BioLabs, Inc. San Diego, CA, USA) 1/2000 für Western blot, 1/200 für Immuno-Elektronenmikroskopie.

Anti-GST-Antikörper (5 mg/ml, Ziege, Nr. 27-4577-01, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) 1/2000 für Western blot, 1/1000 für Immuno-Elektronenmikroskopie.

Anti-Kaninchen-HRP (Esel, Nr. NA 934, Amersham, Braunschweig, D) 1/10000 für Western blot

Anti-Maus-HRP (Schaf, Nr. NXA 931, Amersham Braunschweig, D) 1/10000 für Western blot

Anti-Ziege-Antikörper (Kaninchen, Antikörpersammlung Dr. Heinz Schwarz, Nr. 55 0,6 mg/ml rabbit-anti-goat) 1/100 für Immuno-Elektronenmikroskopie

### 5.1.2.2 Medien

Die Medienkomponenten wurden von Becton Dickinson Microbiology Systems (Le Pont de Claix, F) bezogen und in deionisiertem Wasser gelöst; für Platten wurde Agarose ad 10 g/l für Bakterien und ad 20 g/l für Hefen zugesetzt. Die Medien

wurden für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die Glucose und die Komponenten für das HC-Medium wurden separat autoklaviert beziehungsweise sterilfiltriert und vor Gebrauch steril gemischt. Aminosäuren wurden von Serva (Heidelberg, D), Ampicillin und IPTG von Roth (Karlsruhe, D) und Geneticin (G418) von Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) bezogen.

**Vollmedium:** Bactopecton 20 g/l, Hefeextrakt 10 g/l, Glucose 20 g/l.

**Stickstoffmangelmedium:** Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 1,7 g/l, Glucose 20 g/l.

**Galactose-Medium:** Bactopecton 20 g/l, Hefeextrakt 10 g/l, Galactose je nach Versuch 0,5-2 g/l.

**HC-Selektionsmedien** (Hartwells Complete), je nach Hefemarker werden eine oder mehrere Aminosäuren nicht zugesetzt: 100 ml HC-stock, 100 ml YNB, 100 ml Glucose (200 g/l), 35 ml Uracil (1 g/l), 20 ml Adenin (1 g/l), 12 ml Lysin (10 g/l), 8 ml Tryptophan (10 g/l), 4 ml Leucin (20 g/l), 2 ml Histidin (10 g/l) ad 1 l mit deionisiertem Wasser. (HC-stock: Methionin 0,2 g/l, Tyrosin 0,6 g/l, Isoleucin 0,8 g/l, Phenylalanin 0,5 g/l, Glutaminsäure 1 g/l, Threonin 2 g/l, Asparaginsäure 1 g/l, Valin 1,5 g/l, Serin 4 g/l, Arginin 0,2 g/l; YNB: Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 17 g/l, Ammoniumsulfat 50 g/l).

**LB-Medium:** Bactopecton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l.

Medienzusätze: **G418** Geneticin (20 mg/ml in bidestilliertem Wasser, sterilfiltriert, -20 °C) ad 200 µg/ml in Vollmedium zur Selektion auf den Kanamycin-Resistenzmarker in *S.cerevisiae*; **Amp:** Ampicillin (100 mg/ml Stammlösung in bidestilliertem Wasser, sterilfiltriert, -20 °C) ad 100 µg/ml zur Bakterienselektion mit Ampicillin-Resistenzmarker; **Glucose** (200 g/l in deionisiertem Wasser, autoklaviert) wird ad 2 g/l dem LB-Medium zur Proteinexpression zugesetzt; **IPTG** (1 M in bidestilliertem Wasser, sterilfiltriert, -20 °C).

### 5.1.3 Molekularbiologisches Material

Sofern nicht anders angegeben wurden die Materialien nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Restriktionsenzyme, CiP (Calf Intestinal Phosphatase), T4-DNA-Ligase, 100 bp- und 1 kb-DNA-ladder wurden von der Firma New England Biolabs (Beverly, MA, USA) bezogen. Taq-DNA-Polymerase, deoxy-Nukleotide und Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System wurden bei Promega (Madison, WI, USA) gekauft, SAWADY *Pwo*-DNA-Polymerase bei PEQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D). PCR-Primer wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) hergestellt. Für die TOPO-Klonierungen wurde der PCR<sup>®</sup>T7 TOPO TA oder NT Cloning<sup>®</sup> Kit von Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) verwendet. Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Plasmid Miniprep-Kit von QIAGEN GmbH (Hilden, D) gereinigt. DNA wurde entweder mit den Ultrafree<sup>®</sup>-MC Centrifugal Units von Millipore (Bedford, USA) oder mit Hilfe des GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D) aus Agarosegelen aufgereinigt.

#### 5.1.3.1 Primer für die PCR

Tabelle 5-2: Eingesetzte PCR-Primer

Name	Sequenz 5' - 3'
vps34deltahin	ggataaagtaaacaacaataacatctccgtgaagcattgaggaagggttaccagctga agcttcgtacgc
vps34deltarück	cacaacattccctgagcacatttattagcctgacttgatcgctcgcataggccactagtgatctg
Kdvps34hin	cggactggcgaatacacctcg
Kdvps34rück	cgtcgcatatcaacacatcaggg
GST- Kontrollprimer	catggaccaatgtgcctgg
PXhin	gttctagaggatccatggcagctaattctgtagggaaaatg
PXrück	gacgtcgacttagaattcctttgacaactgcaggaagtcttg
KGFP3hin	ccattacctgtccacacaatctgc
GFP1	cagccatgatgtaaacattgtgagag
CYC1term	cggtagagcggatgtgg
eGFPhin	atgtctaaagggaagaattattcactgg
eGFPrück	tgtgtacaattcatccataccatggg
Galprom	cctctatactttaacgcaaggag
stp22hinFus	ggaattcatgtctgcaaacggcaagatctc
stp22rückFus	cgcgctgactcaaagcttcgataacgggtgaggtgattcggtg
vps4hinFus	ggaattcatgagcacgggagatttttaactaagg
vps4rückFus	cgcgctgacctaaagctgttacctcttgacaaaatctctagtgaac
CFPhinFus	gtctagaaagcttatgagtaaaggagaagaactttcactggagtg
CFPrückFus2	gactagtaagctttttgtatagttcatccatgcatg
CFPrückFus	gactagtaagctttttgtatacacttattttttataacttattaata

## 5.1.3.2 Plasmide

Tabelle 5-3: Eingesetzte Plasmide (Nr. A und ohne Anfangsbuchstaben aus Plasmidsammlungen A. Mayer; Nr. P aus Plasmidsammlung C. Dangelmayr; tragen alle die Ampicillinresistenz).

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung
A12	pTS17 Deletion pep4	Tom Stevens	Integratives LEU2::pep4-Plasmid
A150	pUG6 Kan-Marker	J. H. Hegemann	Kan <sup>r</sup> ; „Template“ zur Herstellung von Deletionsmutanten in Hefe durch homologe Rekombination
A296	GST-PX	C. Ungermann	pGEX-Vam7(1-122), Expression in BI21
A305	GST-PX*	C. Ungermann	pGEX-Vam7(1-122; Y42A), Expression in BI21
A306 FYVE	GST-FYVE <sub>2</sub> ? GST-FYVE <sub>2</sub>	H. Stenmark H. Stenmark / diese Arbeit	<i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> FYVE <sub>2</sub> pGEX-6P-1: FYVE <sub>2</sub> mit <i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> , Expression in BI21
A307	GST-FYVE <sub>2</sub> *	H. Stenmark	pGEX-6P-1: FYVE(C215S) <sub>2</sub> mit <i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> , Expression in BI21
A63	pUG36 pMet25:eGFP	J. H. Hegemann	URA3; CEN6ARSH; Met25-Prom, N-term. eGFP-Fusionsvektor
P140	pMet25:eGFP- FYVE <sub>2</sub>	diese Arbeit	pUG36 mit <i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> FYVE <sub>2</sub>
P142	pMet25:eGFP- FYVE <sub>2</sub> *	diese Arbeit	pUG36 mit <i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> FYVE <sub>2</sub> *
A62	pUG35 pMet25:eGFP	J. H. Hegemann	URA3; CEN6ARSH; Met25-Prom, C-term. eGFP-Fusionsvektor
P144	pMet25:PX-eGFP	diese Arbeit	pUG35 mit <i>Bam</i> HI / <i>EcoRI</i> PX
P146	pMet25: PX*-eGFP	diese Arbeit	pUG35 mit <i>Bam</i> HI / <i>EcoRI</i> PX*
A61	pUG34 pMet25:eGFP	J. H. Hegemann	HIS3; CEN6ARSH; Met25-Prom, N-term. eGFP-Fusionsvektor
9A	p413 Gal1	ATCC 87326	HIS3; CEN6ARSH; Gal1-Promotor
3B	p416 Gal1	ATCC 87332	URA3; CEN6ARSH; Gal1-Promotor
P152	p413 Gal1:eGFP	diese Arbeit	9A mit <i>Xba</i> I eGFP
P154	p416 Gal1: eGFP	diese Arbeit	3B mit <i>Xba</i> I eGFP
P163	p416 Gal1: eGFP-FYVE <sub>2</sub>	diese Arbeit	P154 mit <i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> FYVE <sub>2</sub>
P166	p416 Gal1: eGFP-FYVE <sub>2</sub> *	diese Arbeit	P154 mit <i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> FYVE <sub>2</sub> *
A142	pDH3	Dale Hailey	„Template“ für die PCR zur Herstellung C-terminaler CFP-Fusionsproteine in Hefe durch homologe Rekombination
A143	pDH5	Dale Hailey	„Template“ für die PCR zur Herstellung C-terminaler YFP-Fusionsproteine in Hefe durch homologe Rekombination
P187	p416 Gal1: YFP-FYVE <sub>2</sub>	diese Arbeit	Amp; URA3; CEN6ARSH; Gal1-Promotor: <i>Xba</i> I-YFP- <i>Spe</i> I- <i>EcoRI</i> -FYVE <sub>2</sub> - <i>Sall</i>

P192	p413 Gal1:CFP- Stp22	diese Arbeit	HIS3; CEN6ARSH; Gal1-Promotor: <i>Xba</i> I-CFP- <i>Spe</i> I- <i>Eco</i> RI-STP22- <i>Sal</i> I- stop
P193	p413 Gal1:CFP- Vps4	diese Arbeit	HIS3; CEN6ARSH; Gal1-Promotor: <i>Xba</i> I-CFP- <i>Spe</i> I- <i>Eco</i> RI-VPS4- <i>Sal</i> I- stop
P200	p413 Gal1:CFP	diese Arbeit	HIS3; CEN6ARSH; Gal1-Promotor: <i>Xba</i> I-CFP-stop- <i>Spe</i> I
P204	eGFP-V5-His <sub>6</sub>	diese Arbeit	Expression von eGFP in <i>E. coli</i> BL21

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Molekularbiologie

Allgemeine Vorschriften wurden den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, Brent et al. 1996), beziehungsweise den Vorschriften der eingesetzten Materialien entnommen.

Für Klonierungen wurde die geschnittene DNA aus Agarosegelen isoliert, nachdem der Vektor zusätzlich noch mit CiP dephosphoryliert worden war. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert und in kompetente *E. coli* Top10-Zellen transformiert. Nachdem sie auf LB-Amp-Platten ausgebracht worden waren, wurden sie über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden gepickt und die Plasmide durch „colony-PCR“ und Restriktionsverdau überprüft. Die selektierten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft und ausschließlich fehlerfreie Konstrukte für weiterführende Experimente eingesetzt.

#### 5.2.1.1 Klonierung von P140 / P142: pMet25:eGFP-FYVE<sub>2</sub> / \*

Die Plasmide FYVE und A307 sowie der Vektor A63 wurden mit *Eco*RI und *Sal*I verdaut und die ca. 600 bp großen DNA-Fragmente in den Vektor eingebracht. Die resultierenden Plasmide können in Hefen transformiert werden und führen unter Kontrolle des konstitutiven Met25-Promotors zur Expression von eGFP-FYVE<sub>2</sub> / FYVE<sub>2</sub>\*-Fusionsproteinen.

#### 5.2.1.2 Klonierung von P144 / P146: pMet25:PX / \*-eGFP

Mit den Primern PXhin und PXrück und der Pwo-DNA-Polymerase wurde mit den Plasmiden A296 und A305 als „Template“ ein PCR-Produkt synthetisiert. Dieses

PCR-Produkt wurde mit dem Wizard-Kit aufgereinigt und mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Zusätzlich wurde das Plasmid A62 verdaut und dephosphoryliert. Die 500 bp großen DNA-Fragmente wurden in diesen Vektor eingebracht. Die resultierenden Plasmide können in Hefen transformiert werden und führen unter Kontrolle des konstitutiven Promotors Met25 zur Expression der PX / PX\*-eGFP-Fusionsproteine.

#### 5.2.1.3 Klonierung von P163 / P166: pGal1:eGFP-FYVE<sub>2</sub> / \*

Das Plasmid A61 sowie der Vektor 3B wurden mit *Xba*I verdaut und das 800 bp eGFP-Fragment in den Vektor kloniert (P154). Die Inserts FYVE<sub>2</sub> und FYVE<sub>2</sub>\* wurden aus A306 und A307 mit *Eco*RI / *Sa*II ausgeschnitten und der Vektor P154 ebenso verdaut und dephosphoryliert. Diese Vektoren dienen der Expression der eGFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Gal1-Promotors in Hefe.

#### 5.2.1.4 Klonierung von P187: pGal1:YFP-FYVE<sub>2</sub>

Mit den Primern CFPhinFus und CFPrückFus2 wurde mit dem Plasmid pDH5 als „Template“ und der *Pwo*-DNA-Polymerase ein PCR-Produkt hergestellt, welches das YFP-Gen flankiert von einer *Xba*I-Restriktions-Schnittstelle vor dem Startkodon und eine *Spe*I-Schnittstelle anstelle des Stopkodons enthält. Das PCR-Produkt und das Plasmid P163 wurden mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Spe*I verdaut und der Vektor P163 zusätzlich dephosphoryliert, bevor die DNA-Fragmente isoliert und ligiert wurden. Die Klonierung wurde mit dem Galprom-Primer überprüft. Der Hefevektor kodiert für YFP-FYVE<sub>2</sub> unter der Kontrolle des Gal1-Promotors.

#### 5.2.1.5 Klonierung von P192 / P193 / P200: pGal1:CFP-Stp22 / CFP-Vps4 / CFP

Das Plasmid A61 sowie der Vektor 9A wurden mit *Xba*I verdaut und das 800 bp eGFP-Fragment in den Vektor kloniert, was zum Vektor P154 führte. Durch PCR mit chromosomaler BY4742-DNA als „Template“ und der *Pwo*-DNA-Polymerase wurden mit den Primern stp22hinFus / stp22rückFus beziehungsweise vps4hinFus / vps4rückFus die Gene für Stp22 und Vps4 mit flankierenden *Eco*RI / *Sa*II-Schnittstellen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gereinigt und mit *Eco*RI / *Sa*II verdaut. P152 wurde ebenfalls mit *Eco*RI / *Sa*II verdaut, dephosphoryliert, die geschnittene DNA isoliert und die PCR-Produkte in den Vektor ligiert. Die so

konstruierten Plasmide dienen der Expression von eGFP-Stp22 beziehungsweise eGFP-Vps4 unter der Kontrolle des Gal1-Promotors. Sie tragen den Hefemarker HIS3. Anschließend wurde das eGFP durch CFP beziehungsweise CFP-stop ersetzt: mit den Primern CFPhinFus und CFPrückFus2 bzw. CFPrückFus wurde mit dem Plasmid pDH3 als template und der *Pwo*-DNA-Polymerase ein PCR-Produkt hergestellt. Es enthielt das CFP-Gen flankiert von einer *Xba*I-Schnittstelle vor dem Startkodon und einer *Spe*I-Schnittstelle anstelle des Stopkodons (CFPrückFus2) beziehungsweise 100 bp danach mit mehreren Stopkodons (CFPrückFus). Das PCR-Produkt und die Plasmide mit STP22 / VPS4 wurden mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Spe*I verdaut, der Vektor zusätzlich dephosphoryliert, die DNA-Fragmente isoliert und ligiert. Die Klonierung wurde mit dem Galprom-Primer überprüft. Der Hefevektor P192 kodiert für CFP-Stp22, P193 für CFP-Vps4 und P200 für CFP unter der Kontrolle des Gal1-Promotors.

#### 5.2.1.6 Klonierung von P204: eGFP-V5-His6

Mit den Primern eGFPhin und eGFPrück wurde mit dem Plasmid A63 als „Template“ (mit *Eco*RV verdaut) und der *Pwo*-DNA-Polymerase ein PCR-Produkt hergestellt. Durch eine anschließende 10-minütige Inkubation mit *Taq*-DNA-Polymerase wurde ein A-Überhang an die Enden der linearen ds-DNA angehängt. Diese DNA wurde direkt für die Klonierung mit dem PCR<sup>+</sup>T7 TOPO NT Cloning<sup>+</sup> Kit verwendet. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung mit den beigefügten Primern T7-Promotorprimer und V5 c-term. Reverse Sequencing Primer überprüft.

#### 5.2.1.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe einer PCR-basierten DNA-Sequenzierungsmethode, bei der fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide als Stop-Nukleotid eingebaut werden und die Einzelstrang-DNA durch Gelfiltration im ABI373-Sequenzierer von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D) aufgetrennt wird. Zur Kontrolle der GST-Fusionsproteine wurde der GST-Kontrollprimer verwendet. Für N-terminale eGFP/CFP/YFP-Fusionen wurde der Primer KGFP3hin und für die C-terminalen eGFP-Fusionen der Primer GFP1 eingesetzt. Für die Sequenzierung von DNA vor dem CYC1-Terminator wurde der Primer CYC1term gewählt. Die PCR-Reaktion wurde mit je 0,5 µg DNA, 10 pmol Primer und 3 µl BigDyeTerminator Ready Reaction Mix in 20 µl Endvolumen im



Thermocycler durchgeführt (Gene Amp PCR System 9700, PE Biosystems, Foster City, CA, USA: 30-35 Zyklen mit 20 sec 96 °C, 10 sec 50 °C, 4 min 60 °C - anschließend 4 °C). Die Aufreinigung und Analyse der DNA mit dem Sequenzierer abi373 erfolgte in der Arbeitsgruppe von Stephan Schuster, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen, D. Die Auswertung der Sequenzierdaten wurde mit Hilfe folgender Computerprogramme durchgeführt: EditView, EditSeq, SeqMan, DNA-Strider, sowie mit den Internetseiten von SGD ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) und YPD ([www.proteome.com](http://www.proteome.com)).

### 5.2.1.8 „Colony-PCR“ auf Hefezellen

Tabelle 5-4: Thermocycler-Programm für die „Colony-PCR“ auf Hefezellen

1 x	94 °C	3 min
10 x	94 °C	30 sec
	53 °C	30 sec
	72 °C	1,5 min
30 x	94 °C	30 sec
	57 °C	30 sec
	72 °C	1,5 min
	72 °C	10 min
	4 °C	

Agarosegel aufgetrennt.

Frisch ausgestrichene Hefezellen von einer Agarplatte dienten als „Template“ für die PCR. Dazu wurden je Probe 20 µl PCR-Ansatz auf Eis vorgelegt und mit einer Pipettenspitze Hefezellen zugegeben. Der Reaktionsansatz enthielt 1x Reaktionspuffer ohne MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTPs je 0,2 mM, 0,5 pmol/µl je Primer und 1 Unit Taq-DNA-Polymerase. Im Thermocycler lief das in Tabelle 5-4 angegebene Programm ab. Anschließend wurden 10 µl Ansatz pro Spur in einem 0,8 %-igen

### 5.2.2 Hefetransformationen

Zwei Variationen der Lithium-Acetat-Methode wurden eingesetzt, um Plasmide in Hefestämme einzubringen oder um Deletionsstämme zu konstruieren.

Um verschiedene Plasmide mit Hefe-Selektionsmarkern in Hefen einzubringen wurden kompetente Zellen nach (Schiestl and Gietz 1989) hergestellt und entweder direkt verwendet oder aliquotiert bei -80 °C gelagert. Hefezellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bis 0,7 in Vollmedium bei 30 °C und 200 Upm angezogen. Die Zellen wurden geerntet (500 g, 5 min, RT), in 0,1-0,5 Volumina sterilem deionisiertem Wasser und in 0,1-0,2 Volumina SORB-Lösung gewaschen (SORB: Lithium-O-Acetat 100mM, Tris/Cl 100 mM pH 8,0, EDTA/NaOH 1 mM pH 8,0, Sorbitol 1 M, pH 8 mit Essigsäure eingestellt, autoklaviert). Die Zellen wurden in einem Endvolumen von 360 µl SORB auf 50 ml Ausgangskultur resuspendiert, 40 µl Träger-DNA

zugegeben, aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt (Träger-DNA: Heringssperma-DNA 10 mg/ml, 5 min bei  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und 10 min auf  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, von Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Pro Transformationsansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen und 1-2  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (Minipräp) eingesetzt. Zellen und DNA wurden gemischt, 72  $\mu\text{l}$  PEG zugesetzt und 30 min bei RT inkubiert (PEG: Lithium-O-Acetat 100 mM, Tris/Cl 100 mM pH 8,0, EDTA/NaOH 1 mM pH 8,0, PEG3350 40 % (w/v), autoklaviert). Anschließend wurden 9,3  $\mu\text{l}$  DMSO zugesetzt und die Zellen für 5-20 min bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Für den Stamm BY4742 waren 15 min ausreichend, CRY1 musste 17 min erhitzt werden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen mit sterilem Wasser verdünnt, pelletiert und in 100-200  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert. Je nach Marker wurden die Zellen auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgebracht und für 2-4 Tage bei RT kultiviert. Es wurden Einzelkolonien gepickt und erneut auf Selektionsplatten auf Einzelkolonien ausgestrichen. Von diesen wurde je ein Einzelklon auf Platte vermehrt und in Dauerkultur aufbewahrt (15 % Glycerin,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Zur Herstellung von Deletionsmutanten wurden jeweils frische kompetente Hefezellen verwendet, die leicht abgewandelt nach dem Protokoll von (Gietz, St Jean et al. 1992) hergestellt wurden. Hefezellen wurden in Vollmedium bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 200 Upm bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5 bis 0,7 angezogen. Die Zellen wurden geerntet (500 g, 5 min, RT), in 0,1 Volumina sterilem deionisiertem Wasser und in 0,02 Volumina TE/LiOAc-Lösung gewaschen (TE/LiOAc: Lithium-O-Acetat 100mM, Tris/Cl 100 mM pH 7,5, EDTA/NaOH 1 mM pH 8,0, pH 7,5 mit Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert). Die Zellen wurden in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  TE/LiOAc auf 50 ml Ausgangskultur resuspendiert. Pro Ansatz wurden 5  $\mu\text{l}$  Träger-DNA mit 1 oder 5  $\mu\text{g}$  knockout-DNA gemischt und 50  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen zugegeben (Träger-DNA: Heringssperma-DNA 10 mg/ml, 5 min bei  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und 10 min auf  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, von Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D). Anschließend wurde 300  $\mu\text{l}$  PEG-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt (PEG-Lösung: Lithium-O-Acetat 100mM, Tris/Cl 100 mM pH 7,5, EDTA/NaOH 1 mM pH 8,0, PEG 3350 40 % (w/v), sterilfiltriert). Nach 30 min bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  hitzegeschockt. Für den Stamm BY4742 waren 15 min ausreichend, CRY1 musste 17 min erhitzt werden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen mit sterilem Wasser verdünnt, pelletiert und in 1 ml Medium oder Wasser resuspendiert. Bei Selektion mit dem

Resistenzmarker G418 wurden sie in Vollmedium resuspendiert und 90 min bei 30 °C inkubiert bevor sie auf Agarplatten mit Vollmedium und 200 µg/ml G418 ausplattiert wurden. Bei Selektion auf einen auxotrophen Marker wurden sie auf der entsprechenden HC-Selektionsplatte ausgebracht. Sie wurden für 3-5 Tage bei RT kultiviert. Es wurden Einzelkolonien gepickt und erneut auf Selektionsplatten auf Einzelkolonien ausgestrichen. Von diesen wurde je ein Einzelklon auf Platte vermehrt und in Dauerkultur aufbewahrt (15 % Glycerin, -80 °C).

### 5.2.3 Deletionsmutanten in *S.cerevisiae*

*S.cerevisiae* führt nach der Aufnahme linearer DNA eine homologe Rekombination mit seinem Genom durch, sofern Anfang und Ende der eingebrachten DNA homolog zu chromosomalen Sequenzen ist (Shortle, Haber et al. 1982). Diese besondere Eigenschaft wurde ausgenutzt, um Gene auf chromosomaler Ebene durch einen Selektionsmarker zu ersetzen und so in den haploiden Hefe-Stämmen eine Deletionsmutante herzustellen.

Um das Gen der Proteinase A (*PEP4*) durch den Selektionsmarker *LEU2* zu ersetzen, wurde das Plasmid pTS17 verwendet (von T. Stevens, University of Oregon, Eugene, OR, USA). Nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI erhielt man zwei lineare DNA-Fragmente. Ein Fragment trägt den auxotrophen Marker *LEU2* flankiert von *PEP4*-Sequenzen. Durch Transformation der linearisierten DNA und homologe Rekombination mit dem Genom wird ein  $\Delta pep4$ -Hefestamm erzeugt, der auf HC-Platten ohne Leucin selektiert werden kann (s. 5.2.2). Die Transformanden (CD101 und CD428) wurden durch Herstellung von Proteinextrakten, SDS-PAGE und Western blot gegen das Protein Pep4p überprüft. Das Protein war mit dem Antikörper gegen Pep4p nicht mehr nachweisbar.

Zur Deletion der Proteinase *PRB1* wurde der Hefestamm CD101 mit einem PCR-Produkt transformiert, das homologe Enden zum *PRB1*-Gen hatte, jedoch für Trp1 kodierte. Die PCR wurde nach (Muller, Bayer et al. 2002) und (Brachmann, Davies et al. 1998) mit pRS304 als „Template“ durchgeführt. Die Transformanden (CD656) wurden durch Herstellung von Proteinextrakten, SDS-PAGE und Western blot gegen das Protein Prb1p überprüft.

Um einen  $\Delta$ vps34-Hefestamm herzustellen, wurde ein PCR-Produkt synthetisiert, das flankierende Sequenzen mit Homologien vor dem sowie im *VPS34*-Gen hatte und den Kanamycin-Marker trug. Als „Template“ für die PCR diente das Plasmid pUG6 (Guldener, Heck et al. 1996). Die Reaktion wurde mit den Primern *dvps34hin* und *dvps34rück* mit der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Dieses PCR-Produkt wurde in CRY1 transformiert und die Hefen auf G418-Agaroseplatten selektiert (s. 5.2.2). Die Transformanten wurden durch „Colony-PCR“ überprüft (5.2.1). Dazu wurden die Primerkombinationen *Kdvps34hin* mit *Kdvps34rück* oder *KanContr.* (P89, Primersammlung Andreas Mayer) verwendet. Die ersten beiden Primer liegen vor und nach dem zu deletierenden 1,6 kb-Stück aus *VPS34*, während der Primer *KanContr.* im Kanamycin-Gen liegt. Mit den Wildtyp-Zellen als „Template“ erhielt man nur mit der ersten Kombination ein PCR-Produkt von 1,8 kb. Dagegen wurde in der Deletionsmutante mit *Kdvps34hin* und *Kdvps34rück* ein 2 kb-Produkt und mit den Primern *Kdvps34hin* und *KanContr.* ein PCR-Produkt von 1,2 kb Länge synthetisiert. Der Hefestamm CRY1  $\Delta$ vps34 (Nr. CD541) wurde so gewonnen.

#### 5.2.4 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Für Licht- und Fluoreszenzmikroskopie stand ein Axioplan-Mikroskop von Zeiss (Oberkochen, D) mit dem UPLFL100XO/1.30 UNIV. PLANFLUORIT-Objektiv von Olympus Optical CO. GmbH (Europa, Hamburg, D) zur Verfügung. Es wurden die in Tabelle 5-5 aufgeführten Fluoreszenzfilter eingesetzt. Für Bilder der gefärbten Zellen wurden diese bei 37 °C ad 1 % mit Low Melting Agarose versetzt, auf einen Objektträger gegeben und mit dem Deckglas abgedeckt. Nach 5 bis 60 min bei 4 °C wurden die Zellen mit einer AxioCam-Digitalkamera von Zeiss fotografiert und am Computer mit der Software AxioVision 3.0 gespeichert.

Tabelle 5-5: Fluoreszenzfiltersätze für die Mikroskopie

Fluorophor	Name / Beschreibung
FM4-64	450-490 nm FT510 LP520
GFP	BP546 FT580 LP590
CFP	F31-044
YFP	F41-028
eGFP	F41-017 HQ 470/40 Q495LP H 2 525/50

Für optische Schnitte mit Hilfe der Konfokalen Mikroskopie stand ein Leica Confocal TCS SP2-Mikroskop von Leica Microsystems Heidelberg GmbH (Mannheim, D) zur Verfügung. Die Hefezellen wurden ebenfalls in 1 % Low Melting Agarose eingebettet und mindestens 5 min auf 4 °C abgekühlt. Es wurden die voreingestellten Wellenlängen für GFP-, CFP- und YFP-Fluoreszenz mit der Einstellung 1 Airy (pinhole 121 µm) für die Lochblende verwendet und Serienschnitte mit einem Abstand von ca. 0,5 µm aufgenommen. Die Aufnahmen der Fluoreszenz wurden im tiff-Format abgespeichert und mit dem Computerprogramm ImageJ 1.29 ausgewertet. Zum Quantitativen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in unterschiedlichen Membranbereichen wurde zuerst der Hintergrund der Fluoreszenz abgezogen (meist 7-10 Fluoreszenzeinheiten) und dann je Membranbereich drei Quadrate mit 4x4 Pixeln ausgewählt und die Summe der Fluoreszenzintensität darin notiert. Für jede Zelle wurde der Mittelwert der Fluoreszenz auf der Außenmembran der Vakuole und der Mittelwert der Fluoreszenz auf der intravakuolären Struktur / Einstülpung bestimmt und der Faktor berechnet, um den die Fluoreszenz der intravakuolären Struktur stärker war.

#### 5.2.4.1 FM4-64-Färbung

FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)-pyridinium dibromide, T-3166, Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL) wurde mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor Verwendung wurde der Farbstoff 1/1000 in Medium verdünnt (Vida and Emr 1995).

Die Hefen wurden auf Agarplatten mit Vollmedium ausgestrichen und bei RT 3-5 Tage vermehrt. Sie wurden bei 30 °C und 200 Upm in Vollmedium für ca. 15 h bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 bis 3 angezogen (Duran Reagensglas, D = 20x180 mm, Nr. 9190178, Fisher Scientific, Schwerte, D). Für Standard-FM4-64-Färbungen wurden 0,5 ml Zellen mit einer  $OD_{600nm}$  von 1 geerntet und in 0,5 ml Stickstoffmangelmedium mit 10 µM FM4-64 resuspendiert. Die Zellen wurden für 60 min bei 30 °C mit 200 Upm inkubiert, danach pelletiert, in Stickstoffmangelmedium ohne FM4-64 resuspendiert und für weitere 2 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Um die Frequenz der Bildung Autophagischer Schläuche zu bestimmen, wurden die Zellen pelletiert, auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Sofort danach

wurden die entnommenen Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für  $\Delta$ vps34-Stämme wurde die Dauer der Inkubation mit FM4-64 auf 3 h verlängert, gefolgt von ebenfalls 2 h ohne FM4-64.

#### 5.2.4.2 EGFP / CFP / YFP-Fluoreszenz

Die Hefetransformanden wurden auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und bei RT 3-5 Tage angezogen. Es wurden Übernachtkulturen in Vollmedium angesetzt und bei 30 °C und 200 Upm bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,3-5 inkubiert. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten wurden Volumina von 1-2 ml in Duran-Glasröhrchen von Schott geschüttelt, während für größere Volumina 100 ml-Kölbchen eingesetzt wurden.

Bei Expression von Plasmiden unter Kontrolle des Met25-Promotors wurden die Hefen direkt mikroskopiert beziehungsweise nach weiteren 3-4 Stunden in Stickstoffmangelmedium analysiert.

Wenn die Expression der Fusionsproteine unter Kontrolle des Gal1-Promotors erfolgte, wurden die in Vollmedium logarithmisch wachsenden Zellen mit Galactosemedium (0,2 % Galactose) gewaschen und darin für 3-7 h bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 inkubiert. Anschließend folgte entweder eine erneute Inkubation in Vollmedium oder direkt die Hungerphase in Stickstoffmangelmedium bei einer  $OD_{600nm}$  von 1,0.

### 5.2.5 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Analyse der Mikroautophagocytose wurden die Hefestämme CRY1 und die Deletionsmutante CRY1  $\Delta$ vps34 eingesetzt, durch Hochdruckgefrieren fixiert, gefriersubstituiert und Ultradünnschnitte der in Kunststoff eingebetteten Zellen mit GST-FYVE<sub>2</sub> markiert.

#### 5.2.5.1 Anzucht der Hefezellen und Gefrierfixierung

Die Hefen wurden in einer logarithmisch wachsenden Übernachtkultur zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,3 bis 3 in Vollmedium bei 30 °C und 200 Upm herangezogen. 2 ml  $OD_{600nm}$  wurden geerntet, in 1 ml Stickstoffmangelmedium gewaschen und in 2 ml Stickstoffmangelmedium in Glasröhrchen (Duran Reagensglas, D = 20x180 mm, Nr. 9190178, Fisher Scientific, Schwerte, D) für 4 Stunden bei 30 °C und 200 Upm

geschüttelt. Die Fixierung erfolgte nach (Hohenberg, Mannweiler et al. 1994) durch Dr. Heinz Schwarz, Elektronenmikroskopisches Labor, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen. Die Zellen wurden pelletiert und in Zellulose-Kapillaren mit einem Durchmesser von 200 µm aufgezogen. Kapillarstücke mit einer Länge von 2 mm wurden in Aluminium-Plättchen mit einer Vertiefung (200 µm) mit 1-Hexadecen plaziert und in einer Hochdruckgefriermaschine bei 2100 bar in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren (Bal-Tec HPM 010, Balzers, Liechtenstein).

#### 5.2.5.2 Gefriersubstitution

Die gefrorenen Kapillaren wurden unter flüssigem Stickstoff vom umgebenden Hexadecen befreit und in 2 ml Röhrchen mit Schraubverschluss (Nr. 72.694, Sarstedt) überführt, die das vorgekühlte Substitutionsmedium enthielten (-90 °C). Die weitere Prozessierung erfolgte in einer Gefriersubstitutionseinheit (Balzers FSU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Die Proben wurden für 18-33 h bei -90 °C im Substitutionsmedium gehalten, über 3 h auf -60 °C erwärmt, dort für 4 h gehalten und über weitere 2-3 h auf -40 °C gebracht. Die Proben wurden für 3-8 h bei -40 °C gehalten und danach mehrfach im Lösemittel des Kunststoffes gewaschen. Anschließend wurden sie in mehreren Schritten in den reinen Kunststoff überführt und polymerisiert. Die eingesetzten Kombinationen sind in Tabelle 5-6 dargestellt. Es wurden 50 nm Ultradünnschnitte (Kunststoffschnitte) angefertigt und auf polyloformbefilmte Kupfernetzchen aufgebracht.

Tabelle 5-6: Fixierung und Substitution von Hefen für die Elektronenmikroskopie

Substitutionsmedium	Lösemittel	Kunststoff	Pol.-Bed.
Uranylacetat 0,5 % in Ethanol	Ethanol	Lowicryl K11M	-40 °C, UV
Glutaraldehyd 0,1 % in Methanol/Aceton (1:1)	Ethanol	Lowicryl K11M	-30 °C, UV
Osmiumtetroxid 0,1 % in Aceton	Aceton	Epon bei RT	60 °C
Osmiumtetroxid 0,1 % in Aceton	Ethanol	LR-White bei 4 °C	60 °C
Acrolein 0,5 % in Ethanol	Ethanol	Lowicryl K11M	-40 °C, UV

Pol.-Bed.: Polymerisierungsbedingungen für den Kunststoff

#### 5.2.5.3 Affinitätsmarkierung der Kunststoffschnitte

Die Markierung erfolgte in einer feuchten Kammer, indem die Kupfernetzchen mit den Ultradünnschnitten zur Flüssigkeit gewandt auf Tropfen mit der entsprechenden Lösung gelegt wurden. Das entsprechende Inkubationsschema ist in Tabelle 5-7 dargestellt. Wenn der Kontrast nach der Behandlung mit Uranylacetat noch nicht

ausreichend war, wurde zusätzlich noch mit Bleiacetat nachkontrastiert (Venable and Coggeshall 1965). Die Auswertung der Markierung erfolgte an einem Philips CM10 Elektronenmikroskop

Tabelle 5-7: Schema zur Affinitätsmarkierung von Kunststoffschnitten mit GST-FYVE<sub>2</sub>

	60 min	PB (Phosphatpuffer 8,2 mM pH 7,5, NaCl 0,9 %, ZnCl <sub>2</sub> 10 µM, BSA Fettsäure-frei 2 %)
	1-2 h	1 oder 5 µg/ml GST-FYVE <sub>2</sub> in PB
4x	2 min	PBSZ (Phosphatpuffer 8,2 mM pH 7,5, NaCl 0,9 %, ZnCl <sub>2</sub> 10 µM)
	1 min	1 % Glutaraldehyd in PBSZ
3 x	2 min	PBSZ
3 x	2 min	PB
	1 h	Anti-GST-Antikörper (aus Ziege, 1/1000 in PB)
3 x	2 min	PB
3 x	2 min	PBG (Phosphatpuffer 8,2 mM pH 7,5, NaCl 0,9 %, ZnCl <sub>2</sub> 10 µM, BSA Fettsäure-frei 2 %, Gelatine 0,2 %)
	1 h	Anti-Ziege-Antikörper (aus Kaninchen, 1/100 in PBG)
6 x	2 min	PBG
	45 min	Protein A - 15 nm Gold -Konjugat (1/500 in PBG, Antikörpersammlung Dr. Heinz Schwarz, Nr. 46)
3 x	2 min	PBG
3 x	2 min	PBSZ
	5 min	1 % Glutaraldehyd in PBSZ
4 x	2 min	bidestilliertes Wasser
	2 min	1 % Uranylacetat
	spülen	bidestilliertes Wasser

#### 5.2.5.4 Quantifizierung der Affinitätsmarkierung

Die Quantifizierung der Affinitätsmarkierung auf Hefezellen mit GST-FYVE<sub>2</sub> erfolgte nach (Griffiths 1993). Als Quantifizierungshilfe wurde ein Raster mit Quadraten von 5 mal 5 mm aufgelegt und bestimmt, wie oft die Vakuolenmembran und die Membranen der Einstülpungen die Linien des Rasters kreuzten (Zahl der Linien). Dabei wurde jeder Membranabschnitt entweder der Außenmembran oder der Einstülpung zugeordnet. Es wurden Aufnahmen von Hefezellen mit Vergrößerungen von 24800 und 33600 verwendet, was bedeutet, dass 5 mm auf dem Foto 0,202 µm oder 0,149 µm Länge entsprechen (Linienabstand d). Die Berechnung der Gesamtlänge l erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Membranlänge } l = \text{Linienabstand } d * \text{Zahl der Linien} * \frac{\pi}{4}.$$



Zusätzlich wurde die Anzahl der zugehörigen Goldkörner bestimmt, die auf der Membran oder in einem Radius von 0,15-0,2 µm zu finden waren und das Verhältnis Goldkörner zu Membranlänge berechnet.

### 5.2.6 *in vivo* pH-Bestimmung: CDCFDA- und CFDA-Färbung

5-CFDA (Carboxy-fluorescein diacetate, C-1362, Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL) oder carboxy-DCFDA (Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, C-369, Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL) wurden in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Die Farbstoffe diffundieren durch Membranen und werden im Vakuolenlumen durch unspezifische Esterasen zu Fluorescein-Derivaten gespalten, die in Abhängigkeit vom pH-Wert ihrer Umgebung ihr Fluoreszenzspektrum verändern.

Die Vorschrift für die Färbung wurde anhand folgender Literatur erstellt: Pringle, Preston et al. 1989; Preston, F. et al. 1989; Roberts, Raymond et al. 1991. Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in Vollmedium bei 30 °C und 200 Upm für ca. 15 h bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bis 5 angezogen. Pro Stamm wurde 1 ml Zellen mit einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 geerntet und in 0,5 ml Vollmedium mit 50 mM Natriumcitrat und 10-20 µM CDCFDA (pH 5) oder CFDA (pH 3) resuspendiert. Die Zellen wurden für 10-30 min (CDCFDA) oder 30 min (CFDA) bei 30 °C und 200 Upm weiter inkubiert. Anschließend wurden sie pelletiert, in 200 µl Puffer (Phosphatpuffer 50 mM pH 8,0, Glucose 2 %) resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt (maximal 30 min). Die Fluoreszenzmessung erfolgte in einem Perkin Elmer LS50B Fluorimeter in einer Quatzküvette mit je 80 µl Probe. Es wurden Excitationsspektren von 450 nm bis 490 nm aufgenommen und die Emission bei 530 nm (CDCFDA) oder 515 nm (CFDA) gemessen. Die Spaltbreite für Anregung und Emission betrug 7,5 nm. Die Emissionswerte für 458 und 488 nm wurden verglichen. Zur Ermittlung der relativen Fluoreszenzänderung wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregung von 458 nm von dem Fluoreszenzsignal bei 488 nm abgezogen. Dieser Wert wurde durch das Fluoreszenzsignal bei 458 nm geteilt.

Formel für die relative Fluoreszenzänderung:  $(Em_{488nm} - Em_{458nm}) / Em_{458nm}$

Als Kontrollen dienten der Wildtyp und der  $\square$ vma11-Stamm, sie wurden für jedes Experiment zusätzlich zu den untersuchten Mutanten eingesetzt. Die Ergebnisse der

Deletionsmutanten wurden in Relation gesetzt zur Differenz zwischen Wildtyp (100 %) und  $\Delta$ vma11-Stamm (0 %).

### 5.2.7 Cytosolpräparation aus *S.cerevisiae*

Für die Durchführung der *in vitro* Experimente mit isolierten Vakuolen wurde Cytosol benötigt. Für Standard *in vitro* Mikroautophagocytose-Versuche wurde Cytosol aus dem Hefestamm K91-1A verwendet, der für die beiden alkalischen Phosphatasen Pho8 und Pho13 defizient ist. Vor der Präparation der Zellen wurden diese 3-4 Stunden in Stickstoffmangelmedium inkubiert. Für jede Cytosolpräparation wurde durch eine Cytosoltitration bestimmt, bei welcher Konzentration das beste Luciferase-Aufnahme-Signal erreicht werden konnte. Die optimale Konzentration lag zwischen 2,5 und 3,5 mg/ml Endkonzentration.

Für einige Experimente wurde das Cytosol von Deletionsmutanten benötigt. Parallel dazu wurde das Cytosol des Wildtyps präpariert und damit eine Cytosoltitration durchgeführt. Das Cytosol der Mutante wurde in der Konzentration eingesetzt, die für den entsprechenden Wildtyp optimal war, meist 2,5 mg/ml.

Die Hefezellen wurden über Nacht in Vollmedium bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 5 wachsen gelassen und geerntet (JA-10.500, 2278 g, 5 min, 2 °C in einer Avanti 25 – Zentrifuge von Beckmann, München, D). Pro Liter Kultur wurden sie in 100 ml Stickstoffmangelmedium gewaschen, in einem Liter davon resuspendiert und für 3,5 h bei 30 °C und 200 Upm gehungert. Anschließend wurden sie erneut geerntet, zuerst mit bidestilliertem Wasser mit 2 mM PMSF (4 °C) und danach mit frisch angesetztem Cytosolpuffer gewaschen (Cytosolpuffer: PIPES/KOH 40 mM pH 6,8, Sorbitol 0,2 M,  $MgCl_2$  0,5 mM, KCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,2 mM, Pefabloc 0,1 mM, O-Phenanthrolin 0,05 mM, Leupeptin 0,1  $\mu$ g/ml, Pepstatin A 2,5  $\mu$ g/ml, 4 °C, sterilfiltriert 0,2  $\mu$ m). Das dickflüssige Pellet wurde in flüssigen Stickstoff getropft und bei –80 °C aufbewahrt. Die gefrorenen Hefen wurden mit einem Waring Blender (4 l Volumen, Waring Commercial, New Hartford, USA) mit mehreren Unterbrechungen für insgesamt 5 min in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Der flüssige Stickstoff wurde zweimal aufgefüllt. Die Zelltrümmer wurden unter fließendem Wasser aufgetaut und auf Zellen aus 8 l Kultur 60  $\mu$ l PMSF (200 mM) und 60  $\mu$ l PIC zugesetzt (PIC: Pefabloc 50 mM, O-Phenanthrolin 25 mM, Leupeptin 0,05 mg/ml, Pepstatin A 0,25

mg/ml in wässriger Lösung mit 20 % Ethanol und 10 % Methanol). Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation abgetrennt (SS34, 11000 g, 10 min, 4 °C, in einer Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments, Wilmington, USA). Der Überstand wurde mehrfach in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (TLA-45, 125874 g, 10-20 min, 2 °C, TL-100 Ultrazentrifuge von Beckmann, München, D) und das Cytosol vorsichtig von pelletiertem Material und flotierter Lipidphase abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (5.2.14) bestimmt. Aliquots wurden bei -80 °C aufbewahrt und maximal zweimal aufgetaut.

### 5.2.8 Vakuolenpräparation

Die Vakuolen von Hefezellen zeichnen sich durch eine sehr geringe Dichte aus, da ihr Inhalt starke proteolytische Aktivität besitzt. Dieses Charakteristikum nutzt man aus, um sie nach der Lyse sphäroblastierter Hefezellen mit Hilfe eines Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation zu flotieren. Als Polymer im Dichtegradient dient Ficoll-400, ein nichtionisches synthetisches Saccharose-Polymer mit einem Molekulargewicht von 400 000 (Nr. 17-0400-02, Pharmacia, Freiburg, D).

Je nach Versuchsansatz wurde der Wildtypstamm BY4742 mehrfach oder parallel mit verschiedenen Mutanten im BY4742-Hintergrund für die Vakuolenpräparation eingesetzt. Pro Ansatz wurden Vakuolen aus 400 ml Hefekultur mit einer  $OD_{600nm}$  von 4 nach der folgenden Vorschrift aufgereinigt: Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Übernachtskultur in Vollmedium (30 °C, 200 Upm) bei einer  $OD_{600nm}$  zwischen 2 und 5 geerntet (JA-10.500, 2278 g, 3 min, 2 °C). Sie wurden in 100 ml Puffer mit DTT resuspendiert (Tris/HCl 30 mM pH 8,9, Dithiothreitol 10 mM), für 5 min bei 30 °C inkubiert und anschließend wieder pelletiert (JA-10.500, 2278 g, 2 min, 2 °C). Nach Resuspendieren der Zellen in 15 ml Sphäroblastierungspuffer (Kaliumphosphatpuffer 50 mM pH 7,5, Sorbitol 600 mM, „Yeast lytic enzyme“ 2,25 mg/ml in Vollmedium mit 0,2 % Glucose; „Yeast lytic enzyme“, *Arthro bacter species*, Nr. 36094 von ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA) wurden sie in 30 ml Corex-Glasröhrchen (Nr. 8445, DuPont, Wilmington, USA) überführt und für 26 min bei 30 °C stehend inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA-25.50 mit Adaptern, 3024 g, 1 min, 2 °C) und bei 4 °C in PS-

Puffer (PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, Sorbitol 200 mM) mit 15 % Ficoll resuspendiert. Nach Zugabe von 280 µl DEAE-Dextran (0,4 mg/ml in PS-Puffer mit 15 % Ficoll; (DEAE-Dextran, Nr. 17-0350-01 von Pharmacia, Freiburg, D) wurden die Sphäroblasten 2 min bei 4 °C und 2 min bei 30 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt, in Zentrifugen-Röhrchen überführt (SW41-Ultrazentrifugations-Rotor) und mit 3 ml PS-Puffer mit 8 % und 3 ml PS-Puffer mit 4 % Ficoll-400 überschichtet, bevor mit PS-Puffer aufgefüllt wurde. Durch Ultrazentrifugation (SW41, 154000 g, 85 min, 2 °C, Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge von Beckmann, München, D) wurden die aus den mit DEAE-Dextran lysierten Sphäroblasten freigesetzten Vakuolen bis zur 4 % / 0 % Ficoll-Interphase flotiert. Von dort wurden die Vakuolen entnommen und sofort wieder auf 4 °C gekühlt. Zur Proteinbestimmung nach Bradford (s. 5.2.14) wurden 10 µl eingesetzt. Die Proteinkonzentration bei einer Wildtyppräparation betrug zwischen 0,7 und 1,1 mg/ml, bei Vakuolen aus Deletionsmutanten war die Ausbeute von Stamm zu Stamm verschieden. Direkt nach der Ernte der Vakuolen wurde auf 100 µg Vakuolenprotein 1 µl Proteaseinhibitormix zugesetzt (Pefabloc 50 mM, O-Phenanthrolin 25 mM, Pepstatin A 0,25 mg/ml in wässriger Lösung mit 20 % Ethanol und 10 % Methanol), bevor sie für die *in vitro* Experimente eingesetzt wurden (5.2.9; 5.2.10).

### 5.2.9 *In vitro* Protonenpump-Assay

Der Fluorophor BCECF ändert seine Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um die aktive Aufnahme von Protonen ins Lumen isolierter Vakuolen durch die daraus folgende Alkalisierung des umgebenden Mediums zu beobachten. Die Versuchsdurchführung lehnt sich an (Peters, Bayer et al. 2001) und (Bayer, Reese et al. 2003) an. Die Messung erfolgte in schwarzen nicht beschichteten Mikrotiterplatten (96er) in einem Mikrotiterplatten Fluorimeter SpektraMax Gemini XS von Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) bei 27 °C. Als Nachweisreagens diente BCECF-Dextran (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(and-6)-carboxyfluorescein gekoppelt an Dextran mit einem Molekulargewicht von 70000, D-1880, Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL).

Ein Standard-Reaktionsansatz für die *in vitro* Microautophagocytose (s. 5.2.10) ohne ATP-Mix wurde auf Eis angesetzt. Es wurden je 72 µl Ansatz pro Vertiefung in der Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 8 µl BCECF-Dextran versetzt (BCECF-Dextran 25

$\mu\text{M}$  in PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, Sorbitol 0,2 M, Stammlösung  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , nur einmal aufgetaut). Teilweise wurde Concanamycin A in einer Endkonzentration von  $0,1\ \mu\text{M}$  als Inhibitor der Pumpaktivität eingesetzt (Concanamycin A, 1 mM in Methanol gelöst,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , Nr. 380-034-C100, Alexis Biochemicals Corp., Grünberg, D). Die Mikrotiterplatte mit maximal 16 Proben wurde im Fluorimeter bei  $27\text{ }^\circ\text{C}$  5-10 min vorinkubiert. Durch Zugabe von  $9\ \mu\text{l}$  ATP-Mix (Creatinphosphat 800 mM, ATP 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, Creatinkinase 5 mg/ml, RT) und durch kurzes Schütteln wurde die Pumpreaktion gestartet. Über einen Zeitraum von 10 min wurden Kinetiken aufgenommen (Anregung bei 490 nm, Emission bei 525 nm mit dem Ausschluss bei 515 nm, 6 Messungen pro well mit einem 10-sec-Intervall zwischen den einzelnen Messwerten pro Probe). Zur Auswertung wurde im Auswertungsprogramm SoftMaxPro der Anstieg der Fluoreszenz über 5 min verglichen ( $V_{\text{max}}$  pro sec).

#### 5.2.10 *In vitro* Microautophagocytose: Luciferase-Aufnahme-Assay

Die Bestimmung der microautophagischen Aktivität isolierter Hefevakuolen wurde nach (Sattler and Mayer 2000) durchgeführt. Dazu wurden die Vakuolen (5.2.8) mit Cytosol (5.2.7), Puffer, Salzen, Luciferase und einem ATP-regenerierenden System bei  $27\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Proben bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gehalten oder es wurden verschiedene Inhibitoren zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Vakuolen durch zweimaliges Pelletieren gewaschen und mit Proteinase K behandelt. Im Anschluss daran wurde die aufgenommene Luciferasemenge durch Umsatz ihres Substrates Luciferin und die Vakuolenmenge durch para-Nitrophenyl-Phosphat-Hydrolyse durch die membranständige Alkalische Phosphatase bestimmt.

##### 5.2.10.1 a) Standard Luciferase-Aufnahme-Assay

Direkt nach Ernte der Vakuolen wurden die Proteaseinhibitoren zugesetzt (5.2.8) und auf Eis die Komponenten für den Assay gemischt. Nach 20-30 min auf Eis wurde die Aufnahmereaktion durch Umsetzen auf  $27\text{ }^\circ\text{C}$  gestartet und für 60-70 im Wasserbad inkubiert.

Eine Probe bestand aus  $50\ \mu\text{l}$  Standard-Reaktionsmix in einem silikonisierten Eppendorfcup. Er enthielt je nach Cytosolpräparation 2,5-3,5 mg/ml K91-1A oder Mutanten-Cytosol, KCl ad 105 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Luciferase 17  $\mu\text{g/ml}$ , PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, Sorbitol 0,2 M, ATP-Mix 1x und 0,2 mg/ml Vakuolen. Der ATP-Mix

(10x) enthielt Creatinphosphat 800 mM, ATP 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM und Creatinkinase 5 mg/ml, so dass die MgCl<sub>2</sub>-Endkonzentration 7 mM betrug. Bei Zusatz von Inhibitoren oder Proteinen wurde jeder Probe die gleiche Menge an Lösemittel oder Filtrat zugesetzt, so dass sich die einzelnen Ansätze nur in der Menge der zugesetzten Substanz unterschieden. Entweder wurden die Vakuolen oder der Inhibitor / Lösemittel als letzte Komponente zugegeben. Anschließend wurden die Proben noch 5-10 min bei 4 °C inkubiert, bevor die Aufnahme-reaktion bei 27 °C gestartet wurde. Nach 60-70 min bei 27 °C wurde die Luciferase-Aufnahme-Reaktion durch Umsetzen der Proben auf 4 °C abgestoppt, bevor diese weiter prozessiert wurden (s. unten).

Als Inhibitoren wurden folgende Substanzen eingesetzt: Concanamycin A (1 mM in Methanol, -20 °C, vor Beginn des Experiments in wässriger Lösung verdünnt, Nr. 380-034-C100, Alexis Biochemicals Corp., Grünberg, D), LY294002 (16,3 mM in Methanol, aliquotiert -20 °C, Nr. 270-038-M005, Alexis) und Wortmannin (11,7 mM in Methanol, aliquotiert -20 °C, Nr. 350-020-M005, Alexis), gereinigte Proteindomänen (5.2.11).

#### 5.2.10.2 b) Kinetik der Luciferase-Aufnahme

Um die Luciferase-Aufnahme in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation bei 27 °C bestimmen zu können, wurden Kinetiken mit Inhibitoren oder Proteinzusätzen aufgenommen. Dazu wurde ein vielfacher Standardreaktionsansatz mit BY4742-Vakuolen und K91-Cytosol angesetzt und bei 27 °C inkubiert. Zum angegebenen Zeitpunkt (0, 10, 20, 30, 45, 60 min) wurden 50 µl Ansatz entnommen und zu 1,5 µl Puffer, Lösemittel oder Inhibitor bei 27 °C pipettiert. Außerdem wurde je eine Probe in ein gekühltes Gefäß (4 °C) gegeben. Zum Zeitpunkt 60 min wurden alle Proben auf 4 °C transferiert und die 60 min-Proben den gekühlten Inhibitoren zugegeben.

Es wurden folgende Inhibitoren verwendet: Concanamycin A (ad 1 µM Endkonzentration), LY294002 (ad 0,5 mM), Wortmannin (ad 0,3 mM), GTP $\gamma$ S (ad 3 mM; 100 mM in PIPES/KOH 10 mM pH 7,0, KCl 105 mM -20 °C, Nr. 220647, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D), FCCP (ad 10 µM mit Valinomycin; 100 mM in Methanol -20 °C, Nr. C2920, Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, D), Valinomycin (ad 2 µM mit FCCP; 9 mM in Methanol -20 °C, Sigma-Aldrich Co.) und gereinigtes FYVE<sub>2</sub>-

Protein (ad 0,2 mg/ml; 6,7 mg/ml in PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, KCl 150 mM, s. Proteinreinigungen 5.2.11).

#### 5.2.10.3 c) Extraktion der Vakuolen durch Lipid-Komplexierung vor dem Einsatz im Luciferase-Aufnahme-Assay

Bei den Experimenten mit Cyclodextrinen als Lipidextraktoren wurden die isolierten Vakuolen mit diesen vorinkubiert und durch Flotieren reisoliert, bevor sie für eine Standard-Luciferase-Aufnahme-Reaktion eingesetzt wurden. Die Substanzen  $\alpha$ -Cyclodextrin und Methyl- $\alpha$ -Cyclodextrin wurden vor Versuchsbeginn frisch in PS-Puffer mit 105 mM KCl (PS: PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, Sorbitol 0,2 M) gelöst. Die Vakuolen (0,2 mg/ml in PS-Puffer mit 105 mM KCl, 500  $\mu$ l) wurden für 20 min mit verschiedenen Konzentrationen an Cyclodextrinen oder in Puffer bei 4 °C stehend behandelt. Anschließend wurden sie mit einer 30 %-igen Ficoll-Lösung (in PS-Puffer) auf eine Konzentration von 15 % Ficoll eingestellt und mit 600  $\mu$ l 8 % Ficoll in PS und 300  $\mu$ l PS-Puffer überschichtet. Die Vakuolen wurden für 10 min bei 10000 Upm im Ausschwingrotor (A-12-11, Eppendorf, Hamburg, D) bei 4 °C flotiert und aus der 0 / 8 %-Interphase abgenommen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Vakuolen im Standard-Luciferase-Aufnahme-Assay eingesetzt (s. oben).

#### 5.2.10.4 Prozessierung der Vakuolen nach der Aufnahmereaktion

Nach Beendigung der Luciferase-Aufnahmereaktionen wurden die 50  $\mu$ l Ansatz je mit 300  $\mu$ l PSK-Puffer (PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, KCl 150 mM, 4 °C) versetzt und die Vakuolen pelletiert (6800 g, 4 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Pellets durch sanftes Pipetieren in 300  $\mu$ l PSK gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren und Absaugen wurden die Vakuolen in 50  $\mu$ l PSK (4 °C) resuspendiert. Es wurden je 3  $\mu$ l Proteinase K (5 mg/ml in PSK) zugesetzt. Nach 25-30 min bei 4 °C wurde der Verdau durch Zugabe von 50  $\mu$ l 2 mM PMSF in PSK abgebrochen.

#### 5.2.10.5 Nachweis der aufgenommenen Luciferase

Als Nachweisreagenzien für das Enzym Luciferase diente der Luciferase Assay Kit von Berthold Detection Systems (ELA 011 und ELA 021, Pforzheim, D) oder das Luciferase Assay System von Promega (E1501, Madison, WI, USA) in Kombination mit dem Zell-Lyse-Puffer von Berthold (ELA 031, 1/3 mit Wasser verdünnt). Die

Messung erfolgte im Mikrotiterplatten Luminometer Microlumet Plus von Berthold Technologies (Bad Wildbad, D) in einer weißen Mikrotiterplatte (96er).

Je Probe wurden 25 µl Lösung in die Mikrotiterplatte geben. Es wurden 75 µl Nachweisreagens zugesetzt und die Lumineszenzmessung sofort gestartet. Das Nachweisreagens bestand entweder zu gleichen Teilen aus ELA 011, ELA 021 und ELA 031 oder aus zwei Teilen E1501 von Promega und einem Teil ELA031.

#### 5.2.10.6 Nachweis der Menge an Vakuolenprotein durch einen ALP-Test

Ein membranständiges Markerprotein der Hefevakuole ist die Alkalische Phosphatase Pho8p. Sie setzt bei alkalischen pH-Wert p-Nitrophenylphosphat zum gelben Farbstoff p-Nitrophenol um. Dieses Reaktionsprodukt kann photometrisch bei 400 nm detektiert werden.

Die Nachweisreaktion erfolgte in einer durchsichtigen Mikrotiterplatte mit flachem Boden. Es wurde je 25 µl Probe vorgelegt und die Reaktion bei RT mit 100 µl Phosphatase-Assay-Mix gestartet (Tris/Cl 250 mM pH 8,9, p-Nitrophenylphosphat 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, TritonX-100 0,4 % (v/v)). Nach 1-5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Glycin (1 M pH 11,5) beendet. Die Absorption bei 400 nm (OD<sub>400nm</sub>) wurde in einem SUNRISE-Mikrotiterplatten-Photometer von Tecan (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D) gemessen. Zur Bestimmung der spezifischen ALP-Aktivität der Vakuolen von Hefedeletionsmutanten wurde zusätzlich die ALP-Aktivität in 2-5 µg der isolierten Vakuolen gemessen.

#### 5.2.10.7 Berechnung der spezifischen Luciferase-Aufnahme

Für jede Vakuolenpräparation wurde der spezifische ALP-Faktor F aus dem ALP-Test mit den isolierten Vakuolen direkt berechnet (Doppelbestimmungen):

$$F = OD_{400nm} / ( \text{Entwicklungszeit [min]} * \text{Vakuolenprotein [µg]} )$$

Für jede einzelne Probe wurde die spezifische Luciferase-Aufnahme folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Luciferase [counts]} * F / ( \text{Entwicklungszeit [min]} * OD_{400nm} )$$



Es wurde jeweils die spezifische Luciferase-Aufnahme bei 4 °C von dem Ergebnis bei 27 °C abgezogen. Das Ergebnis beim Wildtyp wurde für den jeweiligen Versuch als 100 % gesetzt. Die Ergebnisse der Mutantenvakuolen oder der Experimente mit Inhibitoren wurden entsprechend berechnet und mit dem Wildtyp-Ergebnis verglichen.

### 5.2.11 Proteinexpression in *E.coli* und Proteinreinigung

Die Plasmide, die uns freundlicherweise zur Proteinexpression zur Verfügung gestellt worden waren (s. Tab. 5-3: GST-PX, GST-PX\*, GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\*) wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung mit dem GST-Kontrollprimer überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass das Plasmid A306 kleiner war als beschrieben und auch im *E.coli*-Stamm BI21 nach IPTG-Induktion nicht zur GST-FYVE<sub>2</sub>-Synthese führte. Allerdings konnte durch einen *EcoRI* / *Sall*-Verdau ein Fragment von ca. 0,6 kb ausgeschnitten werden. Dieses Fragment wurde mit *EcoRI* / *Sall* in den Vektor von A307 umklontiert und das resultierende Plasmid FYVE sequenziert. Es enthielt zwei fusionierte FYVE-Domänen C-terminal zu GST.

Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien: O-Phenanthrolin (Nr. 77510) von Fluka, Buchs, CH; PMSF (Nr. 87091) Leupeptin (Nr. 1017128), Pepstatin A (Nr. 1359053), Pefabloc SC (Nr. 1429869), RNase (Nr. 109142) DNase (Nr. 104159 von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, D); TritonX-100 (Nr. 93426), Lysozym (L-6876), GSH-Agarose (G-4510) und Thrombin (T-4648) von Sigma, Deisenhofen, D. PreScission™ Protease (Nr. 27-0843-01) und Benzamidin-Sepharose<sup>®</sup>6B (Nr. 17-0568-01) von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D; Amicon Ultra15 MWCO 10000 (UFC9 010 08) von Millipore, Bedford, USA.

#### 5.2.11.1 PX und PX\*

Die Expression und Aufreinigung der Proteindomänen erfolgte nach (Cheever, Sato et al. 2001) und (Boeddinghaus, Merz et al. 2002). Zur Expression wurden *E.coli*-BI21-Zellen transformiert mit den Plasmiden GST-PX oder GST-PX\* eingesetzt. 30 min vor Induktion wurde dem Expressionsmedium (LB mit 0,2 % Glucose und 100 µg/ml Ampicillin) 1 mM PMSF zugesetzt. Die Induktion erfolgte für 30 min bei 25 °C mit 0,2 mM IPTG und 1 mM frischem PMSF. Die Zellen wurden ein Mal mit 2 mM PMSF in bidestilliertem Wasser gewaschen und bei –80 °C aufbewahrt. Die

Zellpelletes aus 4 l Expressionsmedium wurden in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und dreimal aus flüssigem Stickstoff aufgetaut (Lysepuffer: Tris/Cl 50 mM pH 7,4, KCl 150 mM, TritonX-100 1 %, PMSF 3 mM, Pefabloc 0,3 mM, O-Phenanthrolin 0,15 mM, Leupeptin 0,3 µg/ml, Pepstatin A 1,5 µg/ml, DNase 15 mg/l, RNase 7,5 mg/l). Beim dritten Auftauen wurden 0,5 mg/ml Lysozym zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 70 % duty, Stufe 8 mit dem Ultraschallstab behandelt (Branson Sonifier 450, von G. Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, D). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (SS34, 11000 g, 30 min, 2 °C, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments, Wilmington, USA) und der Überstand sterilfiltriert (0,8 µm, MillexR-AA, Nr. SLAA 025 LS, Millipore, Bedford, USA). Es wurden 2-3 ml GSH-Agarose zugesetzt und für 1 h bei 4 °C bewegt. Das Säulenmaterial wurde in einer 5 ml-Polypropylensäule (Nr. 29922, Pierce, Rockford, USA) mit 10 Säulenvolumina TK mit TritonX-100 1 % und ohne Triton gewaschen (TK: Tris/Cl 50 mM pH 7,4, KCl 150 mM). Anschließend wurde mit weiteren 5 Volumina PSK-Puffer gewaschen (PSK: PIPES/KOH 10 mM pH 6,8, KCl 150 mM, Sorbitol 0,2 M). Es wurden 45 Units Thrombin in 1 ml PSK-Puffer zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Elution von der Säule erfolgte mit weiterem PSZ-Puffer in 1 ml-Schritten. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden über 100 µl GSH-Agarose-beads und 100 µl Benzamidin-Sepharose gegeben und anschließend mit Amicon Ultra 15 MWCO 10000 bei 4 °C und 200-700 g aufkonzentriert. Das gereinigte Protein wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 5.2.11.2 FYVE<sub>2</sub> und FYVE<sub>2</sub>\*

Die bei (Gillooly, Morrow et al. 2000) beschriebenen Plasmide wurden zur Proteinexpression eingesetzt und die Proteindomänen wie im Folgenden geschildert aufgereinigt. Zur Expression wurden *E.coli*-BI21-Zellen transformiert mit dem Plasmid GST-FYVE<sub>2</sub> oder GST- FYVE<sub>2</sub>\* eingesetzt. Als Expressionsmedium diente LB mit 0,2 % Glucose, 100 µg/ml Ampicillin und 10 µM ZnCl<sub>2</sub>. Die Induktion erfolgte für 2,5-3 h bei 25 °C mit 0,2 mM IPTG und 1 mM PMSF. Nach 60 und 120 min wurde weiteres PMSF (1 mM) zugesetzt. Die Zellen wurden ein Mal mit 2 mM PMSF in bidestilliertem Wasser gewaschen und bei -80 °C aufbewahrt. Die Zellpellets aus 2 l Expressionsmedium wurden in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und 3-mal aus flüssigem Stickstoff aufgetaut (Lysepuffer: Tris/Cl 50 mM pH 7,4, KCl 150 mM, TritonX-100 1 %, PMSF 3 mM, Pefabloc 0,3 mM, O-Phenanthrolin 0,15 mM,

Leupeptin 0,3 µg/ml, Pepstatin A 1,5 µg/ml, DNase 15 mg/l, RNase 7,5 mg/l, ZnCl<sub>2</sub> 10 µM). Beim dritten Auftauen wurden 0,5 mg/ml Lysozym zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 70 % duty, Stufe 8 mit dem Ultraschallstab behandelt (Branson Sonifier 450, von G. Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, D). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (SS34, 11000 g, 30 min, 2 °C, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments, Wilmington, USA) und der Überstand sterilfiltriert (0,8 µm, MillexR-AA, Nr. SLAA 025 LS, Millipore, Bedford, USA). Es wurden 2-3 ml GSH-Agarose zugesetzt und für 1 h bei 4 °C gebunden. Das Säulenmaterial wurde in einer 5 ml-Polypropylensäule (Nr. 29922, Pierce, Rockford, USA) mit 10 Säulenvolumina TKZ mit TritonX-100 1 % und ohne Triton gewaschen (TKZ: Tris/Cl 50 mM pH 7,4, KCl 150 mM, ZnCl<sub>2</sub> 10 µM). Anschließend wurde mit weiteren 5 Volumina PSZ-Puffer gewaschen (PIPES/KOH 10 mM pH 7,1, KCl 150 mM, Sorbitol 0,2 M, ZnCl<sub>2</sub> 10 µM, DTT 1mM). Es wurden 100 Units PreScission Protease in 1 ml PSZ-Puffer zugegeben und für 4 Tage bei 4 °C inkubiert. Die Elution von der Säule erfolgte mit weiterem PSZ-Puffer in 1 ml-Schritten. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden über 100 µl GSH-Agarose-beads und 100 µl Benzamidin-Sepharose gegeben und anschließend mit Amicon Ultra 15 MWCO 10000 bei 4 °C und 200-700 g aufkonzentriert, verdünnt und wieder aufkonzentriert. Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 5.2.11.3 GST-FYVE<sub>2</sub> und GST-FYVE<sub>2</sub>\*

Die bei (Gillooly, Morrow et al. 2000) beschriebenen Plasmide wurden zur Proteinexpression eingesetzt und die Proteindomänen wie oben beschrieben mit folgenden Änderungen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte aus 1,2 l Expressionskultur. Nach dem Waschen der GSH-Säule mit PSK-Puffer mit 10 µM ZnCl<sub>2</sub> wurde GST-FYVE<sub>2</sub> mit 5 mM Glutathion eluiert, GST-FYVE<sub>2</sub>\* mit 50 mM Glutathion. Die Eluate wurden aliquotiert, bei -20 °C aufbewahrt und nur einmal aufgetaut.

#### 5.2.11.4 eGFP-V5-His<sub>6</sub>

Die Proteinexpression erfolgte in *E.coli*-BI21-Zellen für 3,5 h mit 1 mM IPTG bei 30 °C. Aufschluss und Vorbehandlung der Zellen erfolgte wie für PX beschrieben in Lysepuffer (anstelle von Tris/Cl, KCl enthielt er Phosphatpuffer 50 mM pH 8, NaCl

300 mM und 10 mM Imidazol). Die Aufreinigung erfolgte über Ni-NTA-beads von QIAGEN GmbH (Hilden, D), nach Herstellerangaben für lösliche Proteine. Die Säule wurde mit je 10 Säulenvolumina Lysepuffer sowie Waschpuffer mit und ohne Triton (Phosphatpuffer 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol in Phosphatpuffer / NaCl. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration aufkonzentriert und durch Verdünnen und erneutes Aufkonzentrieren in PSK-Puffer mit 10 % Glycerin überführt und aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Aus 2 l Expressionskultur wurden 3 ml eGFP mit einer Proteinkonzentration von 2,2 mg/ml aufgereinigt. Beim den Waschschritten mit den Waschpuffern wurden bereits 20 mg eGFP verunreinigt mit *E.coli*-Proteinen von der Säule gewaschen, aufkonzentriert und getrennt aufbewahrt. Für den quantitativen Western blot wurde die saubere Eluatfraktion mit Elutionspuffer verwendet.

Die erfolgreichen Proteinexpressionen und -Reinigungen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western blot gezeigt (5.2.14; Anti-GST- und Anti-Ziege-HRP zum Nachweis der GST-Fusionsproteine; Anti-GFP und entsprechender sekundärer Antikörper für die eGFP-Reinigung).

### 5.2.12 Expression und Abbau von eGFP-FYVE<sub>2</sub> als *in vivo*-Assay für Mikroautophagocytose

Die Hefestämme, die mit eGFP-Fusionsprotein exprimierenden Plasmiden transformiert waren, wurden frisch auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und bei Raumtemperatur mehrere Tage angezogen.

Die Hefezellen wurden in Vollmedium bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 200 Upm für 15-18 h angezogen und aus der logarithmischen Wachstumsphase zwischen  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,5 und 5 geerntet. Sie wurden in Galactosemedium (0,2 % Galactose) gewaschen und darin bei einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5-1,0 für 3,5-6,5 h induziert. Für jedes Experiment wurde durch Mikroskopieren bestimmt, wann die Zellen der verschiedenen Mutanten gleiche GFP-Mengen enthielten und die Induktion daraufhin abgebrochen. Die Induktion und die anschließende Inkubation in Stickstoffmangelmedium erfolgte in 100 ml-Kölbchen mit 10-20 ml Medium bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 200 Upm. Nach der Induktion wurden Proben entnommen und die übrigen Zellen in Stickstoffmangelmedium gewaschen. Nach 3-4 h in Stickstoffmangelmedium wurden diese ebenfalls geerntet und Proteinextrakte

hergestellt (5.2.13). Es wurde je Hefestamm der gleiche Anteil an Induktionsansatz pro Spur in der SDS-PAGE aufgetragen. 0,5 ml Zellen mit einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 aus der Induktionskultur wurden in 20  $\mu$ l Ladepuffer aufgenommen (s. unten). Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte im Western blot mit einem der Anti-GFP-Antikörper (5.1.2; 5.2.14).

### 5.2.13 Herstellung von Protein-Extrakten aus *S.cerevisiae*

Die Hefezellen wurden alkalisch lysiert und die Proteine mit TCA präzipitiert. Es wurden pro Hefestamm 2,5-5 ml mit einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 geerntet (14000 g, 60 sec) und einmal mit TE-Puffer gewaschen (TE: Tris/Cl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Bis zur weiteren Prozessierung wurden die Pellets bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Zellen wurden in 0,5 ml bidestilliertem Wasser mit 2 mM PMSF resuspendiert und nach Zugabe von 75  $\mu$ l Lysepuffer für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 Upm geschüttelt (Lysepuffer: NaOH 1,85 M,  $\beta$ -Mercaptoethanol 7,4 % (v/v)). Nach Zugabe von 575  $\mu$ l TCA (Trichloressigsäure 50 % (w/v),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurden sie kurz „gevortext“ und für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Proteinpellets wurden für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert (20000 g) und zweimal mit 1 ml Aceton gewaschen. Die getrockneten Pellets wurden in 20  $\mu$ l Ladepuffer auf 0,5 ml Kultur mit einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 aufgenommen (Ladepuffer: Tris/Cl 80 mM pH 6,8, SDS 2 %, Glycerin 10 % (v/v), Bromphenolblau 0,1 mg/ml, EDTA 10 mM,  $\beta$ -Mercaptoethanol 0,7 %, PMSF 1 mM). Sie wurden für 10-20 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschüttelt (200 Upm) und für 5 min bei  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgekocht, bevor sie auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurden.

### 5.2.14 Standard-Methoden zum Protein-Nachweis

#### 5.2.14.1 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976)

Es wurde der Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) zur Proteinbestimmung eingesetzt. Direkt vor Verwendung wurde das Reagens mit 4 Volumina bidestilliertem Wasser verdünnt.

Zur Abschätzung der Konzentration der Vakuolenpräparation wurden 10  $\mu$ l Vakuolen mit 1 ml verdünntem Reagens versetzt und nach 5 min die  $OD_{595nm}$  bestimmt (Photometer Ultrospec 1000, Pharmacia, Freiburg). Der Messwert wurde mit 2 multipliziert und dieser Wert als Vakuolenkonzentration angenommen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Proteine und der Cytosolpräparationen wurde eine Eichgerade mit frisch eingewogenem BSA als Standard hergestellt. Es wurden für die Proben und für die BSA-Standard-Werte nur Messwerte verwendet, die zwischen 0 und 0,3 OD<sub>595nm</sub> lagen. Mit Hilfe der Standard-Werte wurde eine Eichgerade berechnet und die Proteinkonzentration der Proben damit ermittelt.

#### 5.2.14.2 TCA-Fällung von Proteinen aus isolierten Vakuolen

Um isolierte Vakuolen auf Proteinebene analysieren zu können, wurden sie mit TCA (Trichloressigsäure ad 17 %, 4 °C, vergleiche 5.2.13) gefällt und die Pellets 2-mal mit Aceton gewaschen. Die getrockneten Pellets wurden in 20 µl Lämmli-puffer auf 50 µg Protein aufgenommen (Lämmli-puffer: Tris/Cl 80 mM pH 6,8, SDS 2 %, Glycerin 10 % (v/v), Bromphenolblau 0,1 mg/ml, EDTA 10 mM, β-Mercaptoethanol 0,7 %, PMSF 1 mM), für 10-20 min bei 4 °C geschüttelt (200 Upm) und für 5 min bei 94 °C aufgekocht, bevor sie auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurden.

#### 5.2.14.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Es wurden Trenngele mit 10, 12,5 und 15 % in Kombination mit einem Sammelgel, das 5 % Polyacrylamid enthielt, verwendet (Ausubel, Brent et al. 1996). Die Dimensionen des Trenngels waren 14 x 9 x 0,1 cm<sup>3</sup>. Die Auftrennung erfolgte für 2-3 h bei 45 mA. Als Proteinstandards wurden der LMW (Nr. SDS-7) und der HMW (Nr. SDS-6H, Sigma, Saint Louis, USA) mit aufgetrennt. Die Gele wurden entweder direkt mit Coomassie gefärbt oder die Proteine durch Western blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

#### 5.2.14.4 Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Zur direkten Visualisierung der Proteine wurde das Trenngel für 30-60 min in Färbelösung (Serva Blue G 0,1 % in Methanol / Essigsäure (40 % und 10 % (v/v))) geschwenkt und anschließend in Wasser und Methanol / Essigsäure (40 % und 10 % (v/v)) gewaschen, bis sich die Proteinbanden ausreichend vom Hintergrund abhoben. Die gefärbten Gele wurden eingescannt.

#### 5.2.14.5 Western blot

Durch Semi-Dry-blot (Ausubel, Brent et al. 1996) wurden die Proteine mit folgendem Transferpuffer auf eine NC-Membran übertragen: Tris 20 mM, Glycin 150 mM, SDS 0,02 %, Methanol 20 % (v/v). Es wurde die Protran<sup>□</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane Nr. 10 401196 mit der Porengröße 0,45 µm von Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, D verwendet. Der Transfer erfolgte für 40 min bei 3,2 mA pro cm<sup>2</sup>.

Die Membran wurde anschließend mit Ponceau S (0,2 % in TCA-Lösung 3 %) gefärbt und mit deionisiertem Wasser überschüssiges Ponceau S entfernt. Die gefärbte Membran wurde fotokopiert und die Banden des Proteinstandards markiert.

Standard-Immundekorationen erfolgten in PBS mit 5 % Milchpulver, zwischen den Antikörperdekorationen (je 60 min, RT) wurde 3 mal 5 min mit PBS gewaschen (PBS: Phosphatpuffer 8,2 mM pH 7,5, NaCl 0,9 %). Der Nachweis des sekundären HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem Pico- oder Femto-Reagenz von Pierce (Nr. 34080ZZ und Nr. 34095ZZ, Rockford, USA).

## 6 Literaturverzeichnis

- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1996). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Baba, M., M. Osumi, et al. (1995). "Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method." Cell Struct Funct **20**: 465-471.
- Baba, M., K. Takeshige, et al. (1994). "Ultrastructural Analysis of the Autophagic Process in Yeast: Detection of Autophagosomes and Their Characterization." J Cell Biol **124**: 904-913.
- Babst, M., G. Odorizzi, et al. (2000). "Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking." Traffic **1**(3): 248-58.
- Bankaitis, V. A., L. M. Johnson, et al. (1986). "Isolation of yeast mutants defective in protein sorting to the vacuole." Proc Natl Acad Sci U S A **83**: 9075-9079.
- Baron, C. L. and V. Malhotra (2002). "Role of Diacylglycerol in PKD Recruitment to the TGN and Protein Transport to the Plasma Membrane." Science **295**: 325-328.
- Bayer, M. J., C. Reese, et al. (2003). "Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca<sup>2+</sup>-releasing channel." Journal of Cell Biology **162**: 211-222.
- Bellu, A. R. and J. A. K. W. Kiel (2003). "Selective Degradation of Peroxisomes in Yeast." Microsc Res Tech **61**: 161-170.
- Blommaert, E. F. C., U. Krause, et al. (1997). "The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes." Eur J Biochem **243**: 240-246.
- Boeddinghaus, C., A. J. Merz, et al. (2002). "A cycle of Vam7p release from and PtdIns 3-P-dependent rebinding to the yeast vacuole is required for homotypic vacuole fusion." J Cell Biol **157**(1): 79-90.
- Bonangelino, C. J., J. J. Nau, et al. (2002). "Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p." J Cell Biol **156**(6): 1015-28.
- Brachmann, C. B., A. Davies, et al. (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." Yeast **14**(2): 115-32.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Bryant, N. J., R. C. Piper, et al. (1998). "Retrograde traffic out of the yeast vacuole to the TGN occurs via the prevacuolar/endosomal compartment." Journal of Cell Biology **142**(3): 651-63.
- Burd, C. G. and S. D. Emr (1998). "Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains." Molecular Cell **2**(1): 157-62.
- Burd, C. G., M. Peterson, et al. (1997). "A novel Sec18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast." Mol Biol Cell **8**(6): 1089-104.
- Cheever, M. L., T. K. Sato, et al. (2001). "Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes." Nature Cell Biology **3**(7): 613-8.
- Chiang, H., R. Schekman, et al. (1996). "Selective Uptake of Cytosolic, Peroxisomal, and Plasma Membrane Proteins into the Yeast Lysosome for Degradation." J Biol Chem **271**: 9934-9941.
- Cody, C. W., D. C. Prasher, et al. (1993). "Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein." Biochemistry **32**: 1212-1218.
- Cowles, C. R., G. Odorizzi, et al. (1997). "The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole." Cell **91**(1): 109-18.
- Dowhan, W. and M. Bogdanov (2002). Functional roles of lipids in membranes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. D. E. Vance and J. E. Vance. Amsterdam, Elsevier Science B. V.



- Gietz, D., A. St Jean, et al. (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." Nucleic Acids Res **20**(6): 1425.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, et al. (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." Embo J **19**(17): 4577-88.
- Gillooly, D. J., A. Simonsen, et al. (2001). "Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins." Biochem J **355**(Pt 2): 249-58.
- Grava, S., P. Dumoulin, et al. (2000). "Functional analysis of six genes from chromosomes XIV and XV of *Saccharomyces cerevisiae* reveals YOR145c/ARP5 as a strain-dependent essential gene encoding nuclear proteins." Yeast **16**: 1025-1033.
- Griffiths, G. (1993). Quantitation in Immunocytochemistry. Fine structure Immunocytochemistry, Springer Verlag: 413-417.
- Guldener, U., S. Heck, et al. (1996). "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." Nucleic Acids Res **24**(13): 2519-24.
- Harding, T. M., A. Hefner-Gravink, et al. (1996). "Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway." J Biol Chem **271**: 17621-17624.
- Harding, T. M., K. A. Morano, et al. (1995). "Isolation and Characterisation of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway." J Cell Biol **131**: 591-602.
- Härtel, S., H. A. Diehl, et al. (1998). "Methyl-beta-Cyclodextrins and Liposomes as Water-Soluble Carriers for Cholesterol Incorporation into Membranes and Its Evaluation by a Microenzymatic Fluorescence Assay and Membrane Fluidity-Sensitive Dyes." Analytical Biochemistry **258**: 227-284.
- Herman, P. K. and S. D. Emr (1990). "Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular & Cellular Biology **10**(12): 6742-54.
- Hohenberg, H., K. Mannweiler, et al. (1994). "High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes." J. Microscopy **175**: 34-43.
- Horak, J. (2003). "The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast." Biochimica et Biophysica Acta **1614**: 139-155.
- Huang, W. P. and D. J. Klionsky (2002). "Autophagy in yeast: A review of the molecular machinery." Cell Structure & Function **27**(6): 409-420.
- Hutchins, M. U., M. Veenhuis, et al. (1999). "Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway." J Cell Sci **112**: 4079-4087.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, et al. (2000). "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." Nature **408**: 488-492.
- Ishikawa, K., N. L. Catlett, et al. (2003). "Identification of an organelle-specific myosin V receptor." J Cell Biol **160**(6): 887-897.
- Jones, E. W. (2002). "Vacuolar proteases and proteolytic artifacts in *Saccharomyces cerevisiae*." Methods Enzymol **351**: 127-150.
- Jones, E. W., G. C. Webb, et al. (1997). Biogenesis and Function of the Yeast Vacuole. The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology. J. R. Pringle, J. R. Broach and E. W. Jones. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1131.
- Jouni, Z. E., J. Zamora, et al. (2000). "alpha-Cyclodextrin extracts diacylglycerol from insect high density lipoproteins." Journal of Lipid Research **41**: 933-939.
- Katz, M. E., J. Ferguson, et al. (1987). "Temperature-Sensitive Lethal Pseudorevertants of ste Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **115**: 627-636.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-55.

- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor Downregulation and Multivesicular-Body Sorting." Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**: 893-905.
- Khalfan, W. A. and D. J. Klionsky (2002). "Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S.cerevisiae*." Current Opinion in Cell Biology **14**: 468-475.
- Kihara, A., T. Noda, et al. (2001). "Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes Function in Autophagy and Carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **152**: 519-530.
- Kim, J., W. P. Huang, et al. (2002). "Convergence of Multiple Autophagy and Cytoplasm to Vacuole targeting Components to a Perivacuolar Membrane Compartment Prior to de Novo Vesicle Formation." J Biol Chem **277**: 763-773.
- Kim, J. and D. J. Klionsky (2000). "Autophagy, Cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells." Annu Rev Biochem **69**: 303-342.
- Kirisako, T., M. Baba, et al. (1999). "Formation process of Autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in Yeast." J Cell Biol **147**: 435-446.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-21.
- Komada, M., R. Masaki, et al. (1997). "Hrs, a tyrosine kinase substrate with a conserved double zinc finger domain, is localized to the cytoplasmic surface of early endosomes." J Biol Chem **272**: 20538-20544.
- Kozlov, M. M. (2002). Theoretical Aspects: Shape and lipid composition of membrane tubules. European Life Science Organisation Congress (ELSO), Nice, F.
- Kuma, A., N. Mizushima, et al. (2002). "Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast." J Biol Chem **277**: 18619-18625.
- Kunz, J. (2002). Pharmakologische und kinetische Analyse der Mikroautophagozytose in vitro. Medizinische Fakultät. Tübingen, D, Eberhard-Karls-Universität: 88.
- Kunz, J. B., H. Schwarz, et al. (2003). "Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro." J Biol Chem(2003 Dec 15 [Epub ahead of print]).
- Martin, T. F. (1998). "Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 231-64.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization." Science **303**(5657): 531-534.
- Mizushima, N., T. Noda, et al. (1998). "A protein conjugation system essential for autophagy." Nature **395**: 395-398.
- Mizushima, N., Y. Ohsumi, et al. (2002). "Autophagosome formation in mammalian cells." Cell Structure & Function **27**(6): 421-429.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2001). "Dissection of Autophagosome formation using Apg5-deficient Mouse Embryonic Stem Cells." J Cell Biol **152**: 657-667.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2003). "Role of the apg12 conjugation system in mammalian autophagy." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **35**: 553-561.
- Mousavi, S. A., A. Brech, et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase regulates maturation of lysosomes in rat hepatocytes." Biochem J **372**: 861-869.
- Muller, O., M. J. Bayer, et al. (2002). "The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V0 trans-complex formation." Embo J **21**: 259-269.
- Muller, O., T. Sattler, et al. (2000). "Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding." Journal of Cell Biology **151**(3): 519-28.

- Noda, T., A. Matsuura, et al. (1995). "Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **210**: 126-132.
- Odorizzi, G., M. Babst, et al. (2000). "Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast." Trends in Biochemical Sciences **25**(5): 229-35.
- Ogier-Denis, E. and P. Codogno (2003). "Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer." Biochim Biophys Acta **1603**: 113-128.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, et al. (1996). "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." Science **273**: 1392-1395.
- Pan, X., P. Roberts, et al. (2000). "Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p." Mol Biol Cell **11**: 2445-2457.
- Peters, C., M. J. Bayer, et al. (2001). "Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion." Nature **409**(6820): 581-8.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, et al. (2000). "Distinct classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases are involved in Signaling Pathways that control Macroautophagy in HT-29 Cells." J Biol Chem **275**: 992-998.
- Preston, R. A., M. R. F., et al. (1989). "Assay for vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **86**: 7027-7031.
- Pringle, J. R., R. A. Preston, et al. (1989). "Fluorescence Microscopy Methods for Yeast." Methods in Cell Biology **11**: 357-435.
- Raiborg, C., T. E. Rusten, et al. (2003). "Protein sorting into multivesicular endosomes." Curr Opin Cell Biol **15**: 446-455.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, et al. (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." Molecular Biology of the Cell **3**(12): 1389-402.
- Reggiori, F. and D. J. Klionsky (2002). "Autophagy in the Eukaryotic Cell." Eukaryotic Cell **1**: 11-21.
- Reggiori, F. and H. R. Pelham (2001). "Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting." EMBO Journal **20**(18): 5176-86.
- Rehling, P., T. Darsow, et al. (1999). "Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function." Nature Cell Biology **1**(6): 346-53.
- Roberts, C. J., C. K. Raymond, et al. (1991). "Methods for studying the yeast vacuole." Methods in Enzymology **194**: 644-61.
- Roberts, P., S. Moshitch-Moshkovitz, et al. (2003). "Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **14**: 129-141.
- Robinson, J. S., D. J. Klionsky, et al. (1988). "Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases." Molecular & Cellular Biology **8**(11): 4936-48.
- Rothman, J. H., I. Howald, et al. (1989). "Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO Journal **8**(7): 2057-65.
- Rothman, J. H. and T. H. Stevens (1986). "Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway." Cell **47**: 1041-1051.
- Sakai, Y., A. Koller, et al. (1998). "Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates." J Cell Biol **141**: 625-636.
- Sattler, T. and A. Mayer (2000). "Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation." Journal of Cell Biology **151**(3): 529-38.
- Schiestl, R. H. and R. D. Gietz (1989). "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." Curr Genet **16**: 339-346.
- Schu, P. V., K. Takegawa, et al. (1993). "Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting." Science **260**(5104): 88-91.

- Scott, S. V., A. Hefner-Gravink, et al. (1996). "Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole." Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 12304-12308.
- Scott, S. V. and D. J. Klionsky (1998). "Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm." Current Opinion in Cell Biology **10**: 523-529.
- Seglen, P. O. and P. Bohley (1992). Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia **48**. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag.
- Shortle, D., J. E. Haber, et al. (1982). "Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation." Science **217**: 371-373.
- Simonsen, A., A. E. Wurmser, et al. (2001). "The role of phosphoinositides in membrane transport." Current Opinion in Cell Biology **13**(4): 485-92.
- Stack, J. H. and S. D. Emr (1994). "Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities." Journal of Biological Chemistry **269**(50): 31552-62.
- Stenmark, H., R. Aasland, et al. (2002). "The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger." FEBS Lett **513**: 77-84.
- Stenmark, H., R. Aasland, et al. (1996). "Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger." J Biol Chem **271**(39): 24048-54.
- Stromhaug, P. E. and D. J. Klionsky (2001). "Approaching the Molecular Mechanism of Autophagy." Traffic **2**: 524-531.
- Suzuki, K., T. Kirisako, et al. (2001). "The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation." Embo J **20**: 5971-5981.
- Takehige, K., M. Baba, et al. (1992). "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction." J Cell Biol **119**: 301-311.
- Thumm, M., R. Egner, et al. (1994). "Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **349**: 275-280.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **333**: 169-174.
- Tuttle, D. L. and W. A. J. Dunn (1995). "Divergent modes of autophagy in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*." J Cell Sci **108**: 25-35.
- Tuttle, D. L., A. S. Lewin, et al. (1993). "Selective autophagy of peroxisomes in methylotropic yeasts." Eur J Cell Biol **60**: 283-290.
- Vance, D. E. and J. E. Vance, Eds. (2002). Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam, ELSEVIER SCIENCE B.V.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, et al. (2001). "Synthesis and Function of 3-Phosphorylated Inositol Lipids." Annu Rev Biochem **70**: 535-602.
- Venable, J. H. and R. Coggeshall (1965). J Cell Biol **25**: 407-440.
- Vida, T. A. and S. D. Emr (1995). "A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast." Journal of Cell Biology **128**(5): 779-92.
- Wada, Y. and Y. Anraku (1992). "Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. VAM7, a gene for regulating morphogenic assembly of the vacuoles." J Biol Chem **267**(26): 18671-5.
- Weigert, R., M. G. Silletta, et al. (1999). "CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid." Nature **402**: 429-433.
- Wiemken, A., M. Schellenberg, et al. (1979). "Vacuoles: The sole compartments of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)?" Arch Microbiol **123**: 23.
- Wishart, M. J., G. S. Taylor, et al. (2001). "Phoxy lipids: revealing PX domains as phosphoinositide binding modules." Cell **105**: 817-820.

- 
- Wurmser, A. E. and S. D. Emr (1998). "Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities." EMBO Journal **17**(17): 4930-42.
- Wurmser, A. E. and S. D. Emr (2002). "Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy." J Cell Biol **158**: 761-772.
- Yamamoto, A., D. B. DeWald, et al. (1995). "Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast." Molecular Biology of the Cell **6**(5): 525-39.
- Yeo, S. C., L. Xu, et al. (2003). "Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Sci **116**: 3957-3970.
- Zinser, E., C. D. M. Sperka-Gottlieb, et al. (1991). "Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol **173**(6): 2026-2034.

## 7 Anhang

Liste 1: Hefestämme *S.cerevisiae* von Euroscarf, haploide Deletionsmutanten für den ersten mikroskopischen Screen nach Mutanten in der Bildung mikroautophagischer Schläuche.

Gen	Acc.-Nr	Stamm	Gen	Acc.-Nr	Stamm
WT	20000A	BMA64-1A	YJL132w	20227A	WDHN027-01A(A)
YGR224w	20007A	WSCA025-01A(A)	YJL137c	20229A	WDHN041-01D(A)
YBR008c	20008A	WSCA027-02A(A)	YGR187c	20241A	WNBA005-01C(A)
YBR041w	20009A	WSCA029-01C(A)	YGR194c	20243A	WNBA017-06B(A)
YBR042c	20010A	WSCA031-01C(A)	YGR196c	20245A	WNBA025-03B(A)
YBR043c	20011A	WSCA033-02A(A)	YNL227c	20289A	WHYR036-01A(A)
YBR180w	20012A	WSCA035-02C(A)	YNL230c	20290A	WHYR034-01A(A)
YNL066w	20013A	WCUT001-02A(A)	YNL306w	20292A	WHYR032-01A(A)
YNL065w	20014A	WCUT002-02D(A)	YNL311c	20293A	WHYR030-01A(A)
YNL063w	20015A	WCUT003-02A(A)	YNL325c	20294A	WHYR028-01A(A)
YNL058c	20016A	WCUT004-01A(A)	YBR078w	20349A	WBEH041-01A(A)
YNL056w	20017A	WCUT005-05B(A)	YBR129c	20350A	WBEH053-01A(A)
YNL054w	20018A	WCUT006-01B(A)	YBR130c	20351A	WBEH061-01A(A)
YBR260c	20019A	WCUT007-01B(A)	YDL024c	20352A	WBEH011-01A(A)
YBR264c	20020A	WCUT008-05C(A)	YLR049c	20353A	WBEH031-01A(A)
YOL018c	20033A	WHER005-02B(A)	YNL270c	20354A	WBEH021-01A(A)
YOL098c	20034A	WHER011-04D(A)	YBR281c	20379A	WDRN011-01B(A)
YOL101c	20035A	WHER017-01B(A)	YBR284w	20381A	WDRN017-02C(A)
YOL104c	20037A	WHER025-02B(A)	YBR285w	20382A	WDRN004-01A(A)
YOL105c	20038A	WHER031-02D(A)	YBR287w	20383A	WDRN006-01A(A)
YGR221c	20045A	WGLZ002-01A(A)	YBR288c	20384A	WDRN008-01D(A)
YGR223c	20046A	WGLZ005-03A(A)	YBR128c	20412A	WSII001-02D(A)
YGR225w	20047A	WGLZ008-02B(A)	YBR131w	20413A	WSII007-06C(A)
YGR226c	20048A	WGLZ011-01A(A)	YBR133c	20414A	WSII014-01C(A)
YGR231c	20049A	WGLZ014-03A(A)	YBR137w	20415A	WSII019-01D(A)
YGR232w	20050A	WGLZ017-01A(A)	YBR138c	20416A	WSII025-02D(A)
YDL025c	20106A	WADE010-01A(A)	YOR109w	20454A	WRUA002-03B(A)
YJR015w	20107A	WADE060-01A(A)	YNL106c	20456A	WRUA006-02C(A)
YNL008c	20108A	WADE040-01B(A)	YNL101w	20457A	WRUA009-06A(A)
YNL010w	20109A	WADE030-01D(A)	YNL100w	20458A	WRUA012-06C(A)
YNL011c	20110A	WADE020-01C(A)	YNL099c	20459A	WRUA015-06A(A)
YNR039c	20111A	WADE050-01D(A)	YDL186w	20543A	WKEN003-01A(A)
YBL019w	20113A	WAIA001-01A(A)	YDL182w	20544A	WKEN007-01A(A)
YBL024w	20114A	WAIA002-01A(A)	YDL142c	20545A	WKEN011-01A(A)
YBL042c	20115A	WAIA003-01A(A)	YDL119c	20547A	WKEN020-01A(A)
YBL043w	20116A	WAIA004-01A(A)	YDL115c	20548A	WKEN024-01A(A)
YBL046w	20117A	WAIA005-01A(A)	YNL044w	20595A	WHBT015-19B(A)
YNL155w	20118A	WDLY016-01D(A)	YNL045w	20596A	WHBT012-25D(A)
YNL159c	20120A	WDLY014-01C(A)	YNL046w	20609A	WHBT009-16B(A)
YNL164c	20121A	WDLY011-02C(A)	YNL165w	20612A	WHBT002-12B(A)

Liste 1-Fortsetzung: Hefestämme *S.cerevisiae*, haploide Deletionsmutanten für den ersten mikroskopischen Screen nach Mutanten in der Bildung mikroautophagischer Schläuche.

Gen	Acc.-Nr	Stamm	Gen	Acc.-Nr	Stamm
YNL166c	20122A	WDLY009-02C(A)	YJL017w	20644A	WMAS005-01A(A)
YNL168c	20123A	WDLY008-02D(A)	YJL020c	20645A	WMAS006-01D(A)
YDR014w	20174A	WARK002-07A(A)	YLL062c	20703A	WVDM005-01A(A)
YDR015c	20175A	WARK003-05C(A)	YNL309w	20736A	WGLN048-01B(A)
YDR018c	20176A	WARK004-05B(A)	YGR189c	20242A	WNBA011-11D(A)
YDR020c	20177A	WARK005-08B(A)	YNL321w	20739A	WGLN046-01B(A)
YJL107c	20202A	WBLS002-01A(A)	YNL323w	20740A	WGLN044-01A(A)
YJL105w	20203A	WBLS003-01A(A)	YNL326c	20741A	WGLN042-01B(A)
YJL094c	20204A	WBLS004-01A(A)	YNL327w	20742A	WGLN040-01B(A)
YNL125c	20763A	WJQT007-01C(A)	YDL012c	20168E	WNOS025(HO)
YNL127w	20765A	WJQT005-01A(A)	YDL010w	20169E	WNOS029(HO)
YNL128w	20766A	WJQT004-01A(A)	YGL249w	20517E	WBRS001(HO)
YNL129w	20767A	WJQT003-01A(A)	YLR021w	20518E	WBRS002(HO)
YNL328c	20789A	WNPT001-01A(A)	YLR028c	20522E	WBRS006(HO)
YOL111c	20165E	WFBE044(HO)	YLR030w	20523E	WLUS001(HO)
YOL072w	20166E	WFBE048(HO)	YLR034c	20526E	WLUS006(HO)
YDL057w	20167E	WNOS021(HO)			

Liste 2: Hefestämme *S.cerevisiae*, von Euroscarf bezogen, haploid (Nr. CD in Stammsammlung Claudia Dangelmayr)

Nr.	Name	Acc.-Nr.	Genotyp
CD48	BY4742	Y10000	Abkömmling des WT-Stammes S288C: MAT $\square$ his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0
CD339	$\square$ fun12	Y10371	BY4739; Mat $\square$ ; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YAL035w::kanMX4
CD340	$\square$ swj1	Y10429	BY4739; Mat $\square$ ; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YAR043c::kanMX4 Deletion im swh1-Gen
CD341	$\square$ der1	Y13341	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YBR201w::kanMX4
CD342	$\square$ his7	Y13388	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YBR248c::kanMX4
CD343	$\square$ stp22	Y13416	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YCL008c::kanMX4
CD344	$\square$ end6	Y13489	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YCR009c::kanMX4
CD345	$\square$ YDR140w	Y14074	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YDR140w::kanMX4
CD346	$\square$ vid21	Y14196	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YDR359c::kanMX4
CD347	$\square$ YHR021c	Y10984	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YHR021c::kanMX4
CD348	$\square$ mrt4	Y14858	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YKL009w::kanMX4
CD349	$\square$ vid31	Y14903	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YKL054c::kanMX4
CD350	$\square$ rem50	Y11490	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YLL002w::kanMX4

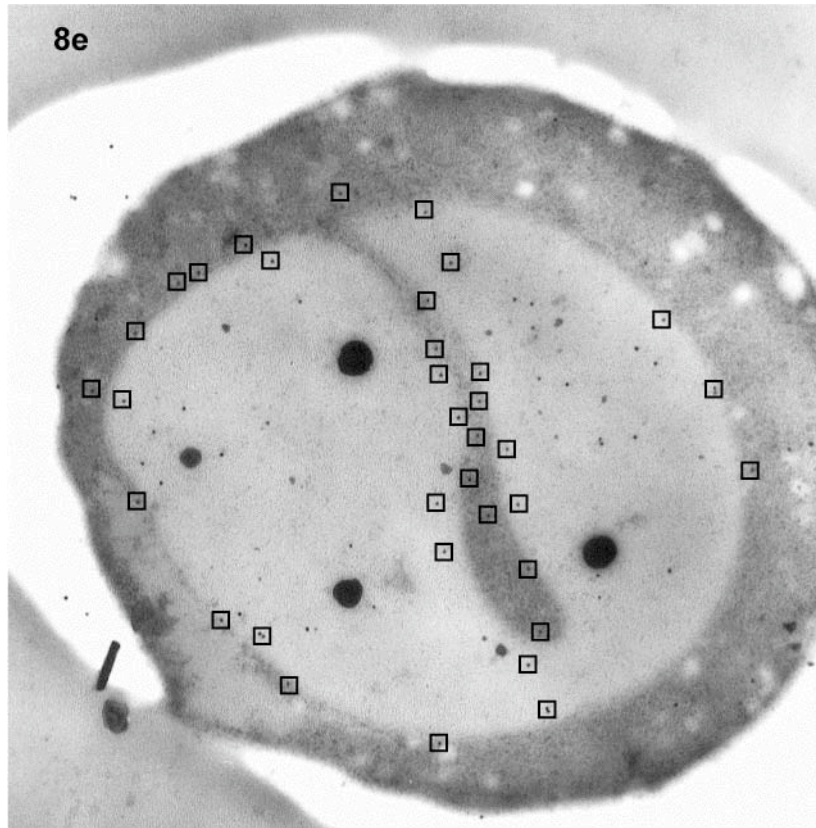
## Anhang

Liste 2-Fortsetzung: Hefestämme *S.cerevisiae*, von Euroscarf bezogen, haploid (Nr. CD in Stammsammlung Claudia Dangelmayr)

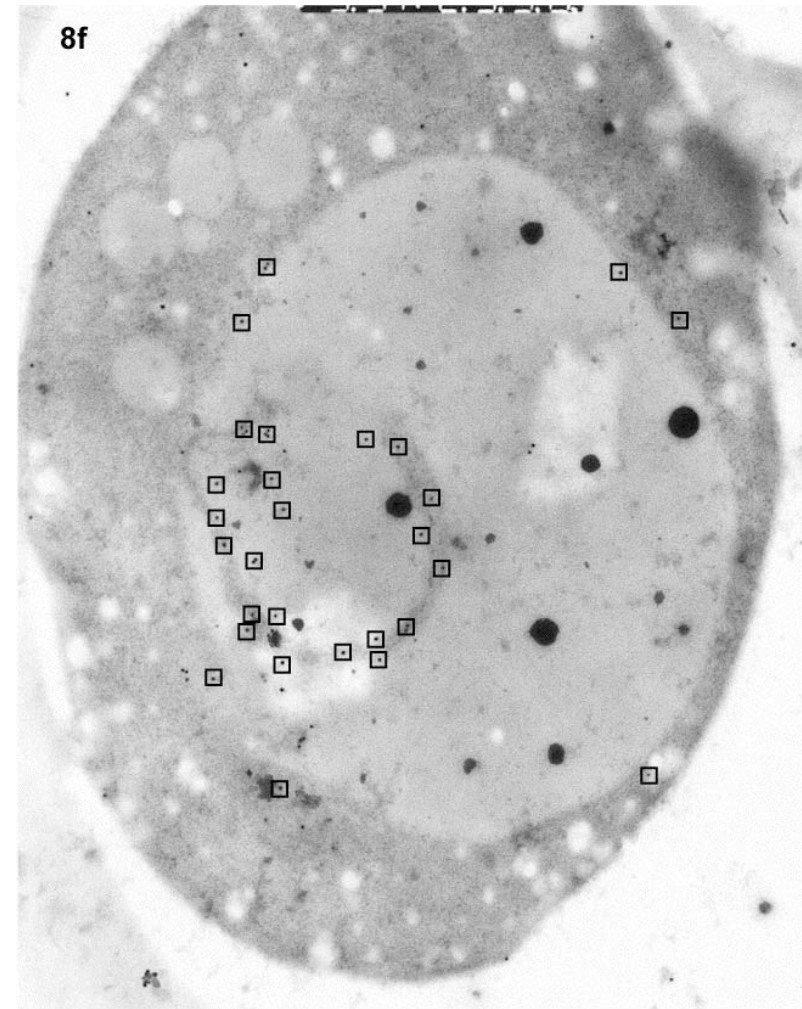
Nr.	Name	Acc.-Nr.	Genotyp
CD351	$\square$ vma11	Y11058	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YPL234c::kanMX4
CD352	$\square$ prm4	Y12096	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YPL156c::kanMX4
CD476	$\square$ vps8	Y00405	BY4741; Mat a; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; met15 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YAL002w::kanMX4
CD477	$\square$ ccr4	Y00387	BY4741; Mat a; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; met15 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YAL021c::kanMX4
CD478	$\square$ cln3	Y00366	BY4741; Mat a; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; met15 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YAL040c::kanMX4
CD479	$\square$ ies6	Y10285	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YEL044w::kanMX4
CD481	$\square$ bub1	Y16589	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YGR188c::kanMX4
CD482	$\square$ bud32	Y15914	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YGR262c::kanMX4
CD483	$\square$ las21	Y11361	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YJL062w::kanMX4
CD484	$\square$ bck1	Y11328	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YJL095w::kanMX4
CD486	$\square$ bdf1	Y15308	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YLR399c::kanMX4
CD487	$\square$ tus1	Y16028	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YLR425w::kanMX4
CD488	$\square$ plc2	Y10507	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YML063w::kanMX4
CD489	$\square$ YMR032w	Y10608	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YMR032w::kanMX4
CD490	$\square$ YNL054w	Y13021	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2D0; ura3 $\square$ 0; YNL054w::kanMX4
CD491	$\square$ arp5	Y17375	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; CD492ura3 $\square$ 0; YNL059c::kanMX4
CD492	$\square$ tof1	Y11171	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YNL273w::kanMX4
CD493	$\square$ mck1	Y11137	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YNL307c::kanMX4
CD494	$\square$ pex6	Y11115	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YNL329c::kanMX4
CD495	$\square$ YOR129c	Y12385	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YOR129c::kanMX4
CD496	$\square$ YOR359w	Y11656	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YOR359w::kanMX4
CD497	$\square$ lbh13	Y12139	BY4742; Mat $\square$ ; his3 $\square$ 1; leu2 $\square$ 0; lys2 $\square$ 0; ura3 $\square$ 0; YPL113c::kanMX4



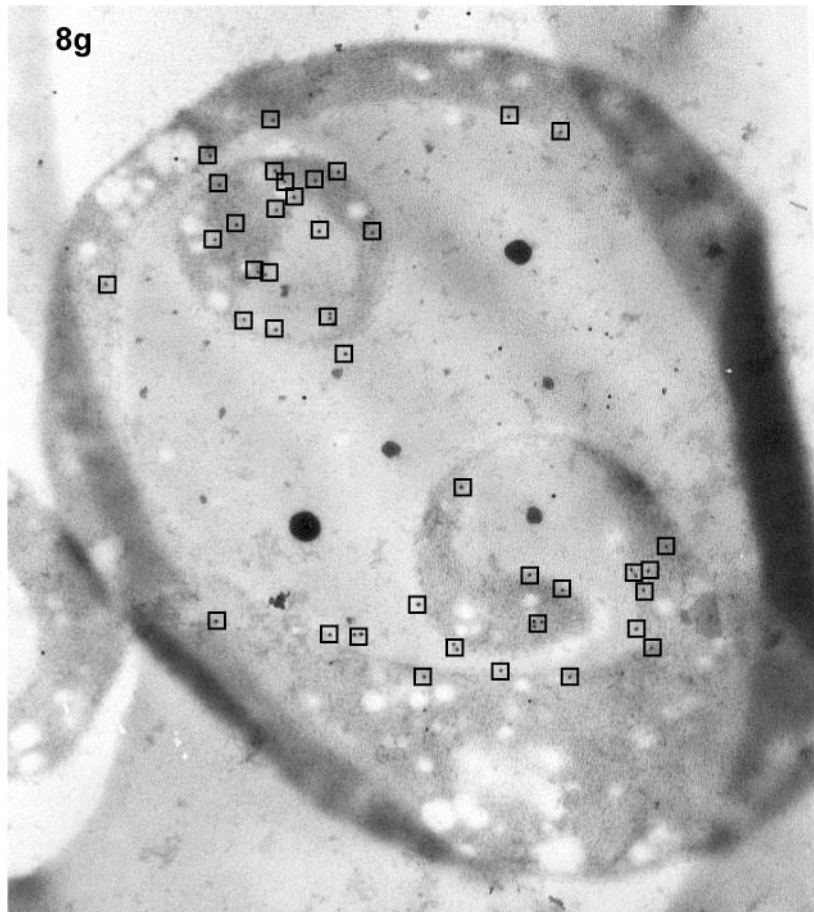
Elektronenmikroskopiebilder aus Abbildung 3-9. Die für die Quantifizierung eingesetzten Goldpartikel sind markiert (quadratische Umrahmung):



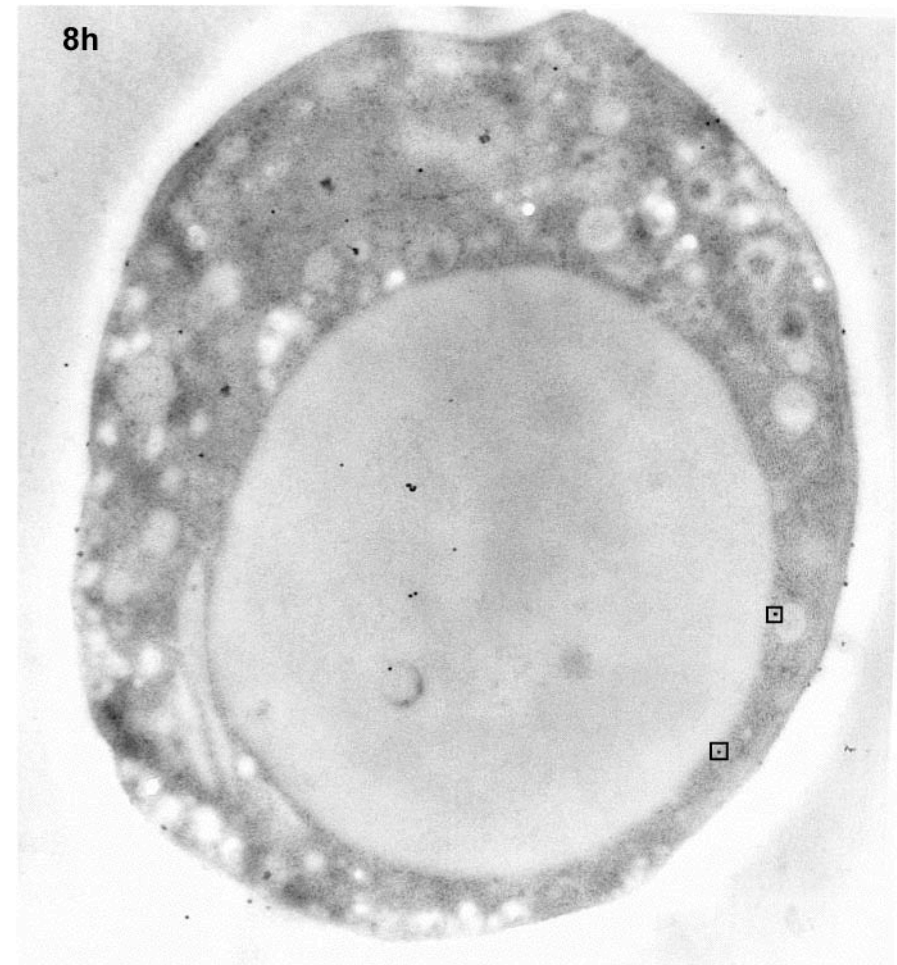
**CRY1 in Stickstoffhungermedium  
Acrolein 0,5 %, K11M  
5 µg/ml GST-FYVE2**



**CRY1 in Stickstoffhungermedium  
Acrolein 0,5 %, K11M  
5 µg/ml GST-FYVE2**



**CRY1 in Stickstoffhungermedium  
Acrolein 0,5 %, K11M  
5 µg/ml GST-FYVE<sub>2</sub>**



**CRY1 delta vps34 in Stickstoffhungermedium  
Acrolein 0,5 %, K11M  
5 µg/ml GST-FYVE<sub>2</sub>**

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Claudia Vera Dangelmayr

03.03.1974 geboren in Fürth / Bayern

## Schulbildung

1980-1984 Grundschule Roßbergschule, Gönningen

1984-1993 Friedrich List-Gymnasium, Reutlingen  
Abschluß: Abitur

## Hochschulstudium

1993-1999 Biochemie-Studium an der Eberhard Karls-Universität, Tübingen

1996 Vordiplom

1996-1998 Hauptstudium, Hauptfach: Biochemie  
Nebenfächer: Organische Chemie, Mikrobiologie

1998-1999 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl Mikrobiologie /  
Membranphysiologie der Fakultät für Biologie, Universität  
Tübingen zum Thema:  
„Eisen(III)-Hydroxamat-Transport in *Escherichia coli* – Untersu-  
chungen zu Wechselwirkungen zwischen den Transportproteinen  
FhuA, FhuB und FhuD“

## Dissertation

1999-2004 Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.  
Dr. Andreas Mayer am Friedrich Miescher-Laboratorium der  
Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen über das Thema:  
„Untersuchung der Mikroautophagocytose in *Saccharomyces  
cerevisiae*“

**Im Selbstverlag herausgegeben von**

**Claudia Vera Dangelmayr**

**Im Winkelrain 73**

**72076 Tübingen**