



Die Rolle von Phosphatasen für die Regulation der Autophagie unter besonderer Berücksichtigung neuronaler Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Weber
aus Siegen

Jülich, Februar 2015

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Koreferent: PD Dr. Oliver Weiergräber

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	12
1.1 Autophagie	12
1.1.1 Die drei Autophagiemechanismen	12
1.1.1.1 Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA)	12
1.1.1.2 Mikroautophagie	13
1.1.1.3 Makroautophagie	13
1.1.1.3.1 Entdeckung der Makroautophagie	15
1.1.1.3.2 An der Makroautophagie beteiligte Proteine und Proteinkomplexe	16
1.1.1.3.2.1 Der ULK1/2-Komplex und der Beclin1-Vps34-Komplex	16
1.1.1.3.2.2 Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme	17
1.1.1.3.2.3 Humane Proteine der Atg8-Familie	19
1.2 Regulation der Makroautophagie	20
1.2.1 Der Insulinrezeptor-Signalweg	20
1.2.2 Der AMPK-Signalweg	22
1.2.3 Der Ras/Raf-Signalweg	22
1.3 Phosphatasen in der Makroautophagieregulation	23
1.3.1 Proteinphosphatase 2A	24
1.3.2 PTEN	24
1.3.3 PTP1B	25
1.3.4 SHP2	25
1.4 Phosphatasemodulatoren	27
1.4.1 bpV(OH)pic	27
1.4.2 Calyculin A	28
1.4.3 Ceramid C6	28
1.4.4 Cypermethrin	28
1.4.5 Ethyl-3,4-dephostatin	28
1.4.6 Fostriecin	29
1.4.7 NaSb-Gluconat	29
1.4.8 Okadainsäure	29
1.4.9 2-Bromo-4'-methoxyphenon	29
1.4.10 Tautomycetin	29
1.5 Regulation der Makroautophagie durch Phosphatasen mit Fokus auf neuronalen Zellen	30
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Verbrauchsmaterial	32
2.1.1.1 Verbrauchsmaterial in der Zellkultur	32
2.1.1.2 Verbrauchsmaterial im Labor (außer Zellkultur)	32
2.1.2 Geräte	32
2.1.2.1 Geräte in der Zellkultur	32
2.1.2.2 Geräte im Labor (außer Zellkultur)	32
2.1.3 Chemikalien	32
2.1.3.1 Medien in der Zellkultur	32
2.1.3.2 Chemikalien in der Zellkultur	32
2.1.3.3 Chemikalien im Labor (außer Zellkultur)	32

2.1.3.4 Puffer und Lösungen	33
2.1.4 Antikörper	33
2.1.5 Proteine	33
2.1.6 Kleine, interferierende RNS (siRNS)	33
2.1.7 Zelllinien	33
2.1.8 Software	33
2.2 Methoden	47
2.2.1 Inkubation von Zellen	47
2.2.2 Mediumwechsel	48
2.2.3 Passage von Zellen	48
2.2.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer	49
2.2.5 Phosphatasemodulator-Tests	50
2.2.5.1 Bestimmung der benötigten Bafilomycin A1-Konzentration	50
2.2.5.2 Phosphatasemodulator-Test – Zeitreihen	51
2.2.5.3 Phosphatasemodulator-Test – Zeitpunkt 4 h	52
2.2.6 Anfertigung von Zelllysaten	53
2.2.7 Versuche mit Phosphatse-siRNS	54
2.2.7.1 RNSi	54
2.2.7.2 Transiente Transfektion	55
2.2.7.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	56
2.2.8 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	58
2.2.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
2.2.10 Proteintransfer und –detektion nach dem Western-Blot-Prinzip	60
2.2.11 Detektion mit mehreren Antikörpern	62
2.2.12 Auswertung der Western-Blots	62
2.2.13 Mykoplasmentest	63
2.2.13.1 Probenvorbereitung für den Mykoplasmentest	63
2.2.13.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	63
2.2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese	65
3 Ergebnisse	67
3.1 Mykoplasmentest	67
3.2 Zeitreihenexperimente mit den Phosphatasemodulatoren	68
3.2.1 Zeitreihe mit bpV(OH)pic	68
3.2.2 Zeitreihe mit Calyculin A	70
3.2.3 Zeitreihe mit Ceramid C6	71
3.2.4 Zeitreihe mit Cypermethrin	72
3.2.5 Zeitreihe mit Ethyl-3,4-dephostatin	73
3.2.6 Zeitreihe mit PTP-Inhibitor II	74
3.2.7 Zeitreihe mit Tautomycetin	75
3.2.8 Zeitreihe ohne Phosphatasemodulator	76
3.2.9 Zeitreihe mit den übrigen Modulatoren	77
3.2.10 Zusammenfassung der Zeitreihenexperimente	77
3.3. Phosphatasemodulator-Experimente zum Zeitpunkt 4 h	78
3.3.1 Phosphatasemodulator-Experimente – LC3B	78
3.3.1.1 Phosphatasemodulator-Experimente – ohne Modulator	78
3.3.1.2 Phosphatasemodulator-Experimente – bpV(OH)pic	79
3.3.1.3 Phosphatasemodulator-Experimente – Calyculin A	80
3.3.1.4 Phosphatasemodulator-Experimente – Ceramid C6	81

3.3.1.5 Phosphatasemodulator-Experimente – Cypermethrin	82
3.3.1.6 Phosphatasemodulator-Experimente – Ethyl-3,4-dephostatin	83
3.3.1.7 Phosphatasemodulator-Experimente – Fostriecin	85
3.3.1.8 Phosphatasemodulator-Experimente – NaSb-Gluconat	86
3.3.1.9 Phosphatasemodulator-Experimente – Okadainsäure	87
3.3.1.10 Phosphatasemodulator-Experimente – PTP-Inhibitor II	88
3.3.1.11 Phosphatasemodulator-Experimente – Tautomycetin	89
3.3.1.12 Zusammenfassung der Phosphatasemodulator-Experimente – LC3B	90
3.3.2 Phosphatasemodulator-Experimente – GABARAP	94
3.3.2.1 Phosphatasemodulator-Experimente – ohne Modulator	94
3.3.2.2 Phosphatasemodulator-Experimente – bpV(OH)pic	95
3.3.2.3 Phosphatasemodulator-Experimente – Calyculin A	96
3.3.2.4 Phosphatasemodulator-Experimente – Ceramid C6	97
3.3.2.5 Phosphatasemodulator-Experimente – Cypermethrin	98
3.3.2.6 Phosphatasemodulator-Experimente – Ethyl-3,4-dephostatin	99
3.3.2.7 Phosphatasemodulator-Experimente – Fostriecin	100
3.3.2.8 Phosphatasemodulator-Experimente – NaSB-Gluconat	101
3.3.2.9 Phosphatasemodulator-Experimente – Okadainsäure	103
3.3.2.10 Phosphatasemodulator-Experimente – PTP-Inhibitor II	104
3.3.2.11 Phosphatasemodulator-Experimente – Tautomycetin	105
3.3.2.12 Zusammenfassung der Phosphatasemodulator-Experimente – GABARAP	106
3.4 Versuche mit RNSi	111
4 Diskussion	115
4.1 Einordnung der Ergebnisse	115
4.1.1 Die Phosphorylierung von Proteinen der LC3-Familie	115
4.1.2 Die Phosphorylierung von Bcl-2	116
4.1.3 Die Phosphorylierung von Proteinen des ULK1/2-Komplexes	116
4.1.4 Die Phosphorylierung von mTORC1	118
4.1.5 Die Phosphorylierung des IR	119
4.1.6 Zusammenfassung der Regulation von Autophagie durch Phosphatasen	120
4.2 Fehlerdiskussion	121
4.3 Ausblick	123
5 Zusammenfassung	124
6 Summary	125
7 Literaturverzeichnis	126
8 Anhang	138
8.1 Abkürzungsverzeichnis	138
8.2 Danksagung	141
8.3 Erklärung	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1) Ablauf der Chaperon-vermittelten Autophagie	13
Abbildung 2) Ablauf der Mikroautophagie	13
Abbildung 3) Ablauf der Makroautophagie	14
Abbildung 4) Übersicht der drei Arten der Autophagie	15
Abbildung 5) Proteinkomplexe in der Autophagieregulation	17
Abbildung 6) Die beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme in der Makrophagieregulation	18
Abbildung 7) Funktionen der Proteine der GABARAP- und LC3-Familie	20
Abbildung 8) Der Insulin-Rezeptor (IR)-Signalweg	21
Abbildung 9) Der AMPK-Signalweg	22
Abbildung 10) Der Ras/Raf-Signalweg	23
Abbildung 11) Regulation des IR-Signalwegs durch Phosphatasen	26
Abbildung 12) Regulation des Ras/Raf-Signalwegs durch SHP2	27
Abbildung 13) Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Phosphatasemodulatoren	30
Abbildung 14) Zählgitter der Neubauer-Zählkammer	49
Abbildung 15) Zählschema in einem der vier Großquadrate	50
Abbildung 16) Versuchsschema für die Zeitreihenexperimente	52
Abbildung 17) Versuchsschema für die Modulatorexperimente – Zeitpunkt 4 h	53
Abbildung 18) Der Prozess der RNS-Interferenz (RNSi)	55
Abbildung 19) Strahlengang bei der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	57
Abbildung 20) Pipettierschema einer Mikrottestplatte bei der Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	59
Abbildung 21) Blotting-Sandwich	61
Abbildung 22) Zyklus bei der Polymerasekettenreaktion (PCR)	64
Abbildung 23) Ethidiumbromid, in doppelsträngige DNS interkaliert	65
Abbildung 24) Ergebnis des Mykoplasmentests	67
Abbildung 25) Auswertung des Zeitreihenexperiments für bpV(OH)pic	69
Abbildung 26) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von bpV(OH)pic	70
Abbildung 27) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Calyculin A	71
Abbildung 28) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Ceramid C6	72
Abbildung 29) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Cypermethrin	73
Abbildung 30) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Ethyl-3,4-dephostatin	74
Abbildung 31) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von PTP-Inhibitor II	75
Abbildung 32) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Tautomycetin	76
Abbildung 33) Veränderung des Autophagieflux in Abwesenheit von Phosphatasemodulatoren	77
Abbildung 34) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen ohne Modulator (-I)	79
Abbildung 35) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit bpV(OH)pic (+I1)	80
Abbildung 36) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Calyculin A (+I2)	81
Abbildung 37) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit	

Ceramid C6 (+I3)	82
Abbildung 38) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Cypermethrin (+I4)	83
Abbildung 39) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ethyl-3,4-dephostatin (+I5)	84
Abbildung 40) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Fostriecin (+I6)	85
Abbildung 41) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit NaSb-Gluconat (+I7)	86
Abbildung 42) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Okadainsäure (+I8)	87
Abbildung 43) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit PTP-Inhibitor II (+I9)	88
Abbildung 44) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Tautomycetin (+I10)	89
Abbildung 45) Die Ergebnisse der Western-Blots für LC3B mit den verschiedenen Phosphatasemodulatoren auf einen Blick	90
Abbildung 46) Quantifizierung des Autophagieflux in Anwesenheit der verschiedenen Phosphatasemodulatoren	91
Abbildung 47) Differenz des Autophagieflux zwischen DMEM und HBSS – LC3B	92
Abbildung 48) Relative Veränderung des Autophagieflux unter Hungerbedingungen – LC3B	93
Abbildung 49) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen ohne Modulator (-I)	95
Abbildung 50) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit bpV(OH)pic (+I1)	96
Abbildung 51) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Calyculin A (+I2)	97
Abbildung 52) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ceramid C6 (+I3)	98
Abbildung 53) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Cypermethrin (+I4)	99
Abbildung 54) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ethyl-3,4-dephostatin (+I5)	100
Abbildung 55) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Fostriecin (+I6)	101
Abbildung 56) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit NaSb-Gluconat (+I7)	102
Abbildung 57) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Okadainsäure (+I8)	103
Abbildung 58) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit PTP-Inhibitor II (+I9)	104
Abbildung 59) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Tautomycetin (+I10)	105
Abbildung 60) Die Ergebnisse der Western-Blots für GABARAP mit den verschiedenen Phosphatasemodulatoren auf einen Blick	107
Abbildung 61) Quantifizierung des Autophagieflux in Anwesenheit der verschiedenen Phosphatasemodulatoren – GABARAP	108

Abbildung 62) Differenz des Autophagieflux zwischen DMEM und HBSS – GABARAP	___	109
Abbildung 63) Relative Veränderung des Autophagieflux unter Hungerbedingungen – GABARAP	_____	110
Abbildung 64) N2A-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNS AF488	___	111
Abbildung 65) Hep G2-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNS AF488	_____	112
Abbildung 66) HEK293-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNS AF488	_____	113
Abbildung 67) HeLa-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNS AF488	_	114
Abbildung 68) Modell für den Effekt von PP2A auf die Aktivierung der Autophagie	_____	118
Abbildung 69) Modell für den Effekt von PTP1B auf die Aktivierung der Autophagie	_____	120
Abbildung 70) Möglichkeiten der Regulation der Autophagie durch Phosphatasen	_____	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1) Verbrauchsmaterial in der Zellkultur	34
Tabelle 2) Verbrauchsmaterial im Labor (außer Zellkultur)	35
Tabelle 3) Geräte in der Zellkultur	36
Tabelle 4) Geräte im Labor (außer Zellkultur)	37
Tabelle 5) Medien und Medienzusätze in der Zellkultur	38
Tabelle 6) Chemikalien in der Zellkultur	38
Tabelle 7) Chemikalien im Labor (außer Zellkultur) (1)	40
Tabelle 8) Chemikalien im Labor (außer Zellkultur) (2)	41
Tabelle 9) Zusammensetzung von 3 M NaCl-Lösung	42
Tabelle 10) Zusammensetzung von 1 M MgCl ₂ -Lösung	42
Tabelle 11) Zusammensetzung von 0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Lösung, pH 6,8	42
Tabelle 12) Zusammensetzung von 1,5 M Tris-Lösung, pH 8,8	42
Tabelle 13) Zusammensetzung von DNase-Lösung	42
Tabelle 14) Zusammensetzung von vierfach-konzentriertem Laemmli-Puffer	42
Tabelle 15) Zusammensetzung von Tris-gepufferter Salzlösung (TBS)	42
Tabelle 16) Zusammensetzung von TBS mit Tween20 (TBST)	43
Tabelle 17) Zusammensetzung von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)	43
Tabelle 18) Zusammensetzung des Lysepuffers für die Zelllyse	43
Tabelle 19) Zusammensetzung des Laufpuffers für die SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
Tabelle 20) Zusammensetzung des ersten Anodenpuffers (An1) beim Western-Blotting	43
Tabelle 21) Zusammensetzung des zweiten Anodenpuffers (An2) beim Western-Blotting	43
Tabelle 22) Zusammensetzung des Kathodenpuffers beim Western-Blotting	44
Tabelle 23) Zusammensetzung des Stripping-Puffers	44
Tabelle 24) Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung zum Anfärben von Gelen	44
Tabelle 25) Zusammensetzung von Sammelgelen	44
Tabelle 26) Zusammensetzung von Trenngelen	44
Tabelle 27) Zusammensetzung von Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TEE-Puffer)	44
Tabelle 28) Antikörper	45
Tabelle 29) Proteine	45
Tabelle 30) siRNS	45
Tabelle 31) Zelllinien	46
Tabelle 32) Software	46
Tabelle 33) Wahl der Modulatoren, Wirkung und eingesetzte Volumina	51
Tabelle 34) Pipettierschema für den Mykoplasmentest	63
Tabelle 35) Einstellungen für die PCR	65

1 Einleitung

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für die vorliegende Arbeit dargestellt und erläutert. Außerdem soll hier ein Überblick über die Ziele der Arbeit und die zugrunde liegenden Arbeitshypothesen gegeben werden.

1.1 Autophagie

Autophagie setzt sich zusammen aus den griechischen Wörtern „auto“ für „selbst“ und „phagein“ für „essen“. Unter Autophagie versteht man einen Abbauprozess für Proteine und Proteinaggregate, sowie (Teile von) Zellorganellen. Neben dem Abbau von Proteinen durch Autophagie existiert auch der durch das Proteasom. Im Gegensatz zum proteasomalen Abbau werden bei der Autophagie die abzubauenen Zellbestandteile dem Lysosom zugeführt, in dem der Abbau stattfindet. Dieser Abbaumechanismus wurde etwa zeitgleich mit dem Lysosom in den 1950er und 1960er Jahren erstmals beobachtet [1, 2]. Autophagie ist ein in Eukaryoten (von einzelligen Hefen bis zum Menschen) hochgradig konservierter Prozess.

1.1.1 Die drei Autophagiemechanismen

Es wurden bisher drei verschiedene Formen von Autophagie charakterisiert, die in diesem Kapitel erläutert werden.

1.1.1.1 Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA)

30% der zytosolischen Proteine enthalten die Aminosäuresequenz „KFERQ“ oder ein ähnliches Motiv, welches als Erkennungssequenz für den Abbau durch Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) dient [3]. Beobachtet wurde die CMA zuerst an Fibroblastenzellen unter Entzug von Wachstumsfaktoren [4]. Insbesondere unter solchen Mangelbedingungen (z.B. Entzug von Wachstumsfaktoren, Hunger) aber auch unter oxidativem Stress [5] wird die CMA induziert. Im Alter ist die Aktivierung der CMA reduziert [6].

Der Vorgang, der sich bei der CMA abspielt, ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Das KFERQ-Motiv eines abzubauenen Proteins wird vom *Heat shock cognate of 70 kDa* (Hsc70) erkannt [7], mit Hilfe einer Reihe von Co-Chaperonen (z.B. *Hsp70 interacting protein* [8] oder *Heat shock protein of 90 kDa* [9]) wird das abzubauenen Substrat gebunden und an der zytosolischen Seite des Lysosoms vom Rezeptor *Lysosome-associated membrane protein type 2A* (Lamp-2A) erkannt [10]. Das abzubauenen Protein wird in das Lysosom transportiert und kann dort von intralysosomalen Proteasen abgebaut werden.

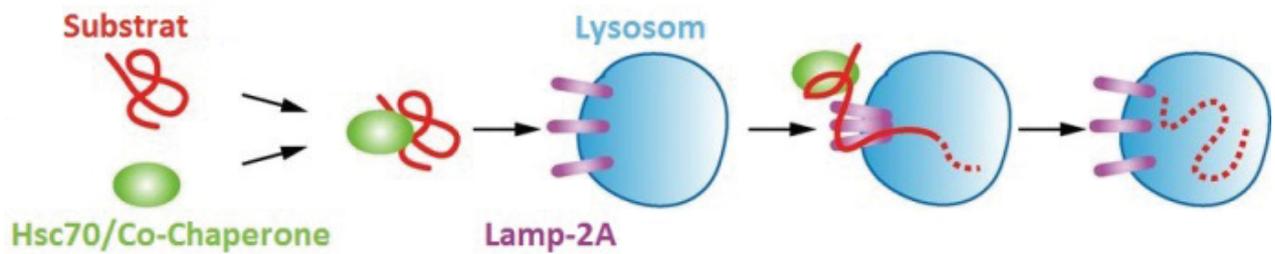


Abb. 1) Ablauf der Chaperon-vermittelten Autophagie (modifiziert nach [11]). Das Substratprotein (rot) wird von Hsc70 und Co-Chaperonen (grün) erkannt und gebunden. In der Folge bindet es an den Rezeptor Lamp-2A (violett) und wird in das Lysosom (blau) eingeschleust. Dort wird es abgebaut.

1.1.1.2 Mikroautophagie

Mikroautophagie ist ein Prozess, bei dem die Membran des Lysosoms (bzw. der Vakuole) Teile des Zytoplasmas umschließt, welche dann im Lysosom (in der Vakuole) abgebaut werden (siehe dazu auch Abb. 2).

Die meisten Studien über Mikroautophagie wurden an Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* durchgeführt. Dabei wurden nicht-selektive Mikroautophagie-Mechanismen und selektive Mikroautophagie-Mechanismen identifiziert [12]. Letztere dienen insbesondere dem Verdau von spezifischen Zellorganellen wie Mitochondrien und Peroxisomen [13] oder auch des Zellkerns [14].

In Säugerzellen ist Mikroautophagie wenig erforscht; in einigen Zellen wurden vom Energiestatus der Zelle abhängige Mikroautophagie-artige Prozesse beobachtet [15].

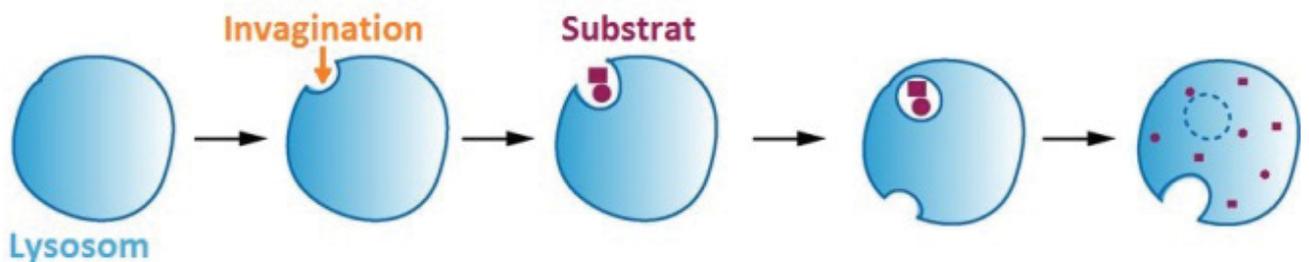


Abb. 2) Ablauf der Mikroautophagie (modifiziert nach [11]). Ein Teil der Lysosomenmembran stülpt sich ein und umschließt dabei das abzubauen Substrat (violett) im Zytoplasma. Dieses wird dann im Lysosomenlumen abgebaut.

1.1.1.3 Makroautophagie

Die dritte Form der Autophagie ist die Makroautophagie. Dabei bildet sich ausgehend von einer Phagophore ein Vesikel, das Autophagosom, das zytoplasmatische Substrate umschließt und mit dem Lysosom fusioniert, in dem diese dann abgebaut werden. Der Prozess wird durch Abb. 3 schematisch zusammengefasst. Die Herkunft der Membran für die Phagophore in Säugerzellen ist derzeit noch Gegenstand der wissenschaftlichen Debatte [16]. Man vermutet, dass sie sich aus Anteilen der Plasmamembran und von Membranen der

Mitochondrien oder des endoplasmatischen Retikulums (ER) zusammensetzen könnte [17]. Hierbei ist insbesondere eine als Omegasom bekannte, mit dem ER in Verbindung stehende Struktur in den Fokus der Debatte gerückt [16, 18].

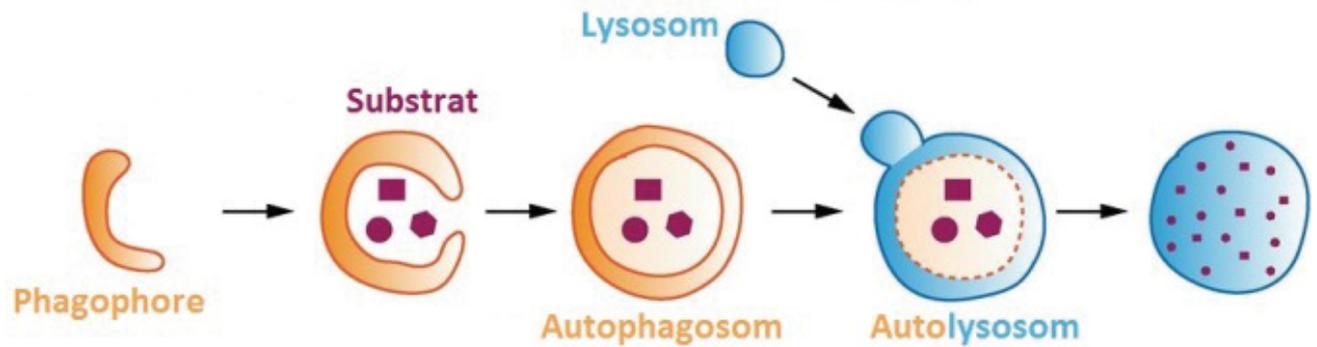


Abb. 3) Ablauf der Makroautophagie (modifiziert nach [11]). Die Membran der Phagophore verlängert sich und umschließt dabei die im Zytoplasma befindlichen abzubauenden Substrate (violett). Nach der Fusion der Membranenden wird das Vesikel Autophagosom genannt. Das Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom und gibt so seinen Inhalt in das Lumen des Lysosoms ab. Dort werden die eingeschlossenen Substrate abgebaut.

In Abb. 4 sind alle drei Formen der Autophagie in einem Schema zusammengefasst dargestellt.

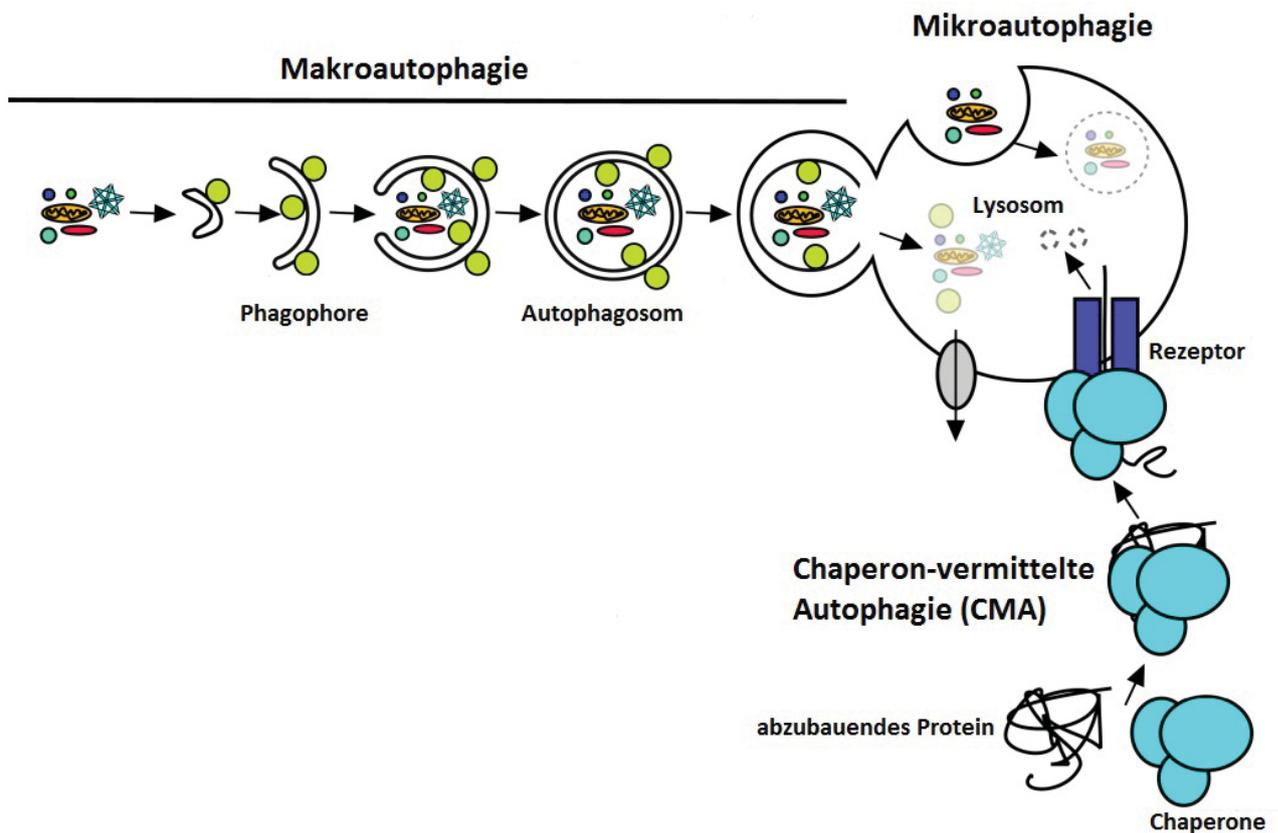


Abb. 4) Übersicht der drei Arten der Autophagie (modifiziert nach [19]). Dargestellt sind die drei verschiedenen Formen der Autophagie: Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA), Mikroautophagie und Makroautophagie. Bei der CMA werden Proteine, die eine Signalsequenz enthalten, von Chaperonen erkannt und über einen lysosomalen Rezeptor zum Abbau in das Lysosom eingeschleust. Bei der Mikroautophagie werden durch Invagination der Lysosomenmembran Bestandteile (Proteine, Organellen) der Zelle umschlossen und dem Lysosom zum Abbau zugeführt. Bei der Makroautophagie werden die abzubauenen Stoffe (Proteine, Organellen, intrazelluläre Pathogene) von einer Doppellipidmembran umschlossen, die sich schließt und als Vesikel (Autophagosom) zum Lysosom gelangt. Durch Fusion mit der Lysosomenmembran gelangt das Innere des Autophagosoms in das Lysosom.

1.1.1.3.1 Entdeckung der Makroautophagie

Zu Beginn der Forschung an der Makroautophagie wurde diese für einen unspezifischen Prozess gehalten. Allerdings verdichteten sich mit zunehmender Forschung die Hinweise, dass es in der Zelle spezifische Substrate für die Makroautophagie gibt [20, 21]. So sind mittlerweile verschiedene Formen wie z.B. Mitophagie [22], Retikulophagie und Ribophagie [23], Aggrephagie [24], Pexophagie [25] oder Xenophagie [26] bekannt.

Makroautophagie ist in den meisten Zellen eukaryotischer Organismen konstitutiv auf einem basalen Level aktiviert [27]. Während Perioden zellulären Stresses (etwa unter Hungerbedingungen [28], beim Fehlen von Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin [29] oder von zellulären Bausteinen wie z.B. Aminosäuren [30], unter oxidativem Stress [31]), aber auch bei Infektionen mit Bakterien [32] oder Viren [33] wird die Makroautophagie aktiviert. So gewährleistet die Zelle die Aufrechterhaltung der Homöostase. Die (De-)Regulation der

Makroautophagie spielt damit eine wichtige Rolle bei zahlreichen Krankheiten oder „Fehlfunktionen“ des Organismus wie Krebs [34], neurodegenerativen Krankheiten [35, 36], bei Alterungsprozessen [37-39], Infektionen durch Krankheitserreger [32, 33, 40, 41] oder Diabetes [42, 43].

Obwohl Makroautophagie anfangs an Säugerzellen beschrieben wurde, war es vor allem die Forschung an Hefezellen, mit der die Regulationsmechanismen auch in Säugerzellen aufgeklärt werden konnten. Ohsumi et al. beobachteten, dass sich die Morphologie autophagischer Organellen von Säuger- und Hefezellen stark ähnelt [44]. In der Folge wurden Hefezellen hinsichtlich der Effekte von Mutationen gescreent und 1997 wurde die Entdeckung des ersten *Autophagy-related protein* (Atg) Atg1 publiziert [45]. Mittlerweile sind mehr als dreißig Atg-Proteine in Hefen bekannt¹. Diese sind je nach ihrer Funktion für die Makroautophagie in unterschiedliche Gruppen unterteilt. Insbesondere die Atg-Proteine, die basaler Bestandteil aller oben aufgeführten Formen der Makroautophagie sind, werden auf diese Weise eingeteilt.

Inzwischen wurden sowohl Säugetierhomologe für die meisten der Atg-Proteine aus Hefen identifiziert (z.B. [46, 47]) als auch säugerspezifische Atg-Proteine, wie z.B. Atg101 charakterisiert [48, 49]. Auch in anderen Eukaryoten wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) oder *Arabidopsis thaliana* konnten Homologe gefunden werden.

1.1.1.3.2 An der Makroautophagie beteiligte Proteine und Proteinkomplexe

Wie bereits erwähnt, werden die Atg-Proteine nach ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt. Einige davon werden in diesem Kapitel näher beschrieben.

1.1.1.3.2.1 Der ULK1/2-Komplex und der Beclin1-Vps34-Komplex

Einen Proteinkomplex bilden die Proteine *Unc-51-like kinase* (ULK) 1/2 (homolog zu Atg1), mAtg13 (homolog zu Atg13), Atg101 und *Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD* (FIP200). Dieser Komplex ist wesentlich an der Initiation der Makroautophagie beteiligt [50, 51]. Unter Hungerbedingungen liegen ULK1/2 hypophosphoryliert vor und können u.a. mAtg13 und FIP200 phosphorylieren (wie in Abb. 5 A dargestellt). Hierdurch wird die Autophagosombildung stimuliert.

Ein weiterer Komplex ist der Beclin1-*Vacuolar protein sorting* (Vps) 34-Komplex. Weitere Bestandteile außer Beclin1 (homolog zu Atg6) und Vps34, einer Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase, sind Atg14L, Vps15 und einige weitere Adapterproteine, die die Aktivität des Komplexes regulieren können (z.B. *UV irradiation resistance-associated gene* (UVRAG), *Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy* (Ambra1) als Aktivatoren und *RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin-1 interacting protein* (Rubicon) als Inhibitor). Dieser Komplex erzeugt aus Phosphatidylinositol Phosphatidylinositol-3-Phosphat, welches die Makroautophagieinduktion und die Bildung von Autophagosomen stimuliert [52, 53]. In Abb. 5 B ist der Komplex schematisch dargestellt.

¹ <http://ruo.mbl.co.jp/g/product/protein/autophagy/autophagy.html>

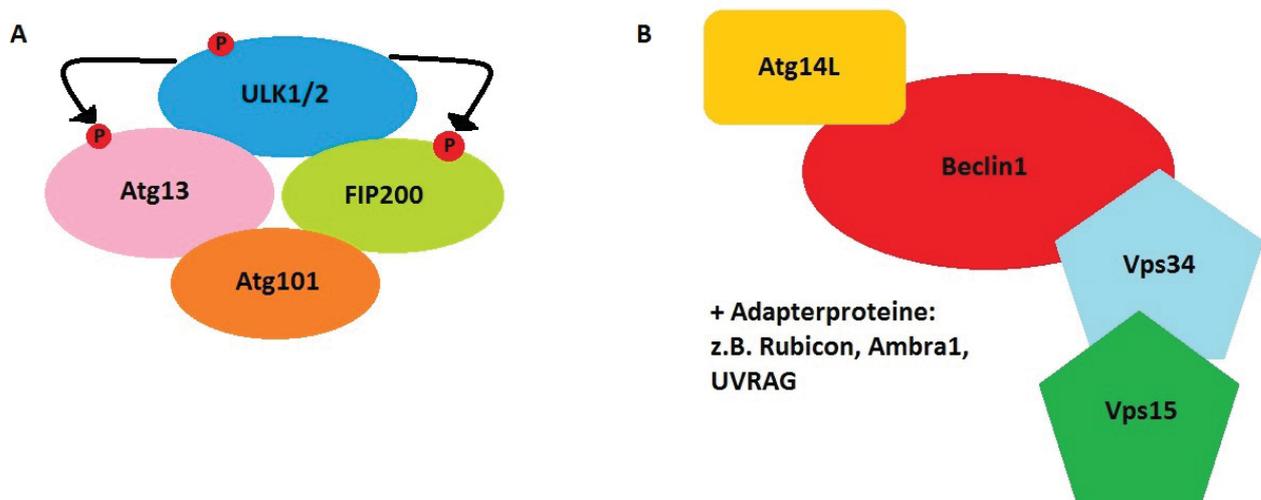


Abb. 5) Proteinkomplexe in der Autophagieregulation. A: Der ULK1/2-Komplex. Unter induzierenden Bedingungen (ULK1/2 ist nur schwach phosphoryliert) kann ULK1/2 Atg13 und FIP200 phosphorylieren, wodurch die Makroautophagie aktiviert wird. B: Der Beclin1-Vps34-Komplex. An den Komplex können Adapterproteine binden, die dessen Aktivität regulieren.

1.1.1.3.2.2 Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme

Zusätzlich sind an der Autophagosombildung zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme beteiligt, an deren Ende der Einbau von lipidierten Atg8-Homologen in die Phagophorenmembran steht [54].

Wesentlicher Bestandteil des ersten Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystems ist ein Komplex aus Atg12 und Atg5. Die Reaktion zur Bildung des Komplexes wird durch das E1-ähnliche Enzym Atg7 und das E2-ähnliche Enzym Atg10 katalysiert. Der Atg12-Atg5-Komplex bindet zusätzlich das Protein Atg16 über Atg5, wodurch ein multimerer Atg12-Atg5-Atg16-Komplex entsteht [55, 56], der hauptsächlich auf der Außenseite der Phagophore lokalisiert ist und sich vor der kompletten Reifung des Autophagosoms von dessen Oberfläche ablöst [57].

Im zweiten Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystem wird von der Vorform eines Atg8-Homologs eine C-terminale Sequenz durch Atg4 abgespalten [58, 59]. Durch das E1-ähnliche Enzym Atg7 wird das Atg8-Homolog aktiviert und über das E2-ähnliche Enzym Atg3 unter Einfluss des Atg12-Atg5-Atg16-Komplexes kovalent an Phosphatidylethanolamin (PE), ein Membranlipid, gebunden [60]. Atg8-PE bzw. Atg8-II entsteht. Dieses ist auf der Außen- und Innenseite der Phagophore vorhanden [61]. Das auf der Außenseite befindliche Atg8-II kann nach der Reifung des Autophagosoms durch Atg4 wieder von PE abgespalten werden, während das auf der Innenseite der inneren Autophagosomenmembran befindliche Atg8-II gemeinsam mit den im Autophagosom enthaltenen Substraten im Lysosom abgebaut wird. Die beiden Konjugationssysteme und der Ablauf der Reaktionen mit den beteiligten Enzymen sind in Abb. 6 zusammengefasst.

Die Funktionen und die Relevanz der humanen Atg8-Homologe werden im folgenden Kapitel besprochen.

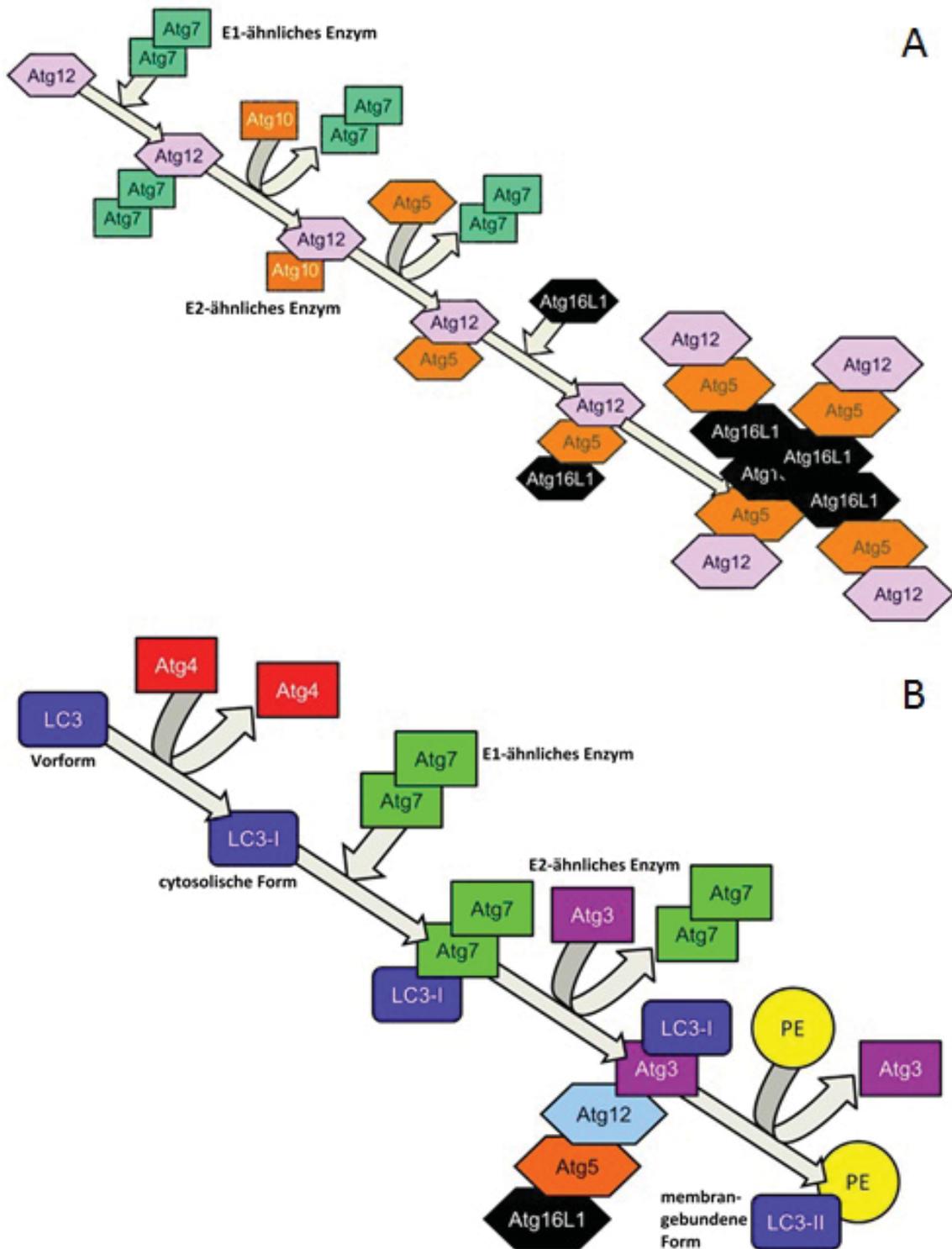


Abb. 6) Die beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme in der Makrophagieregulation (modifiziert nach [62]). A: Die Bildung des Atg12-Atg5-Atg16-Komplexes. Atg12 wird durch Atg7 und Atg10 an Atg5 gebunden. Dieser Proteinkomplex bildet dann durch Bindung an Atg16 (Atg16L1 bei Menschen) ein Multimer. B: Die Kopplung eines Atg8-Homologs (hier *Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3* (MAP1LC3 oder kurz LC3) an Phosphatidylethanolamin (PE). Die zytosolische Vorform von LC3 wird durch Atg4 in eine ebenfalls zytosolische, aktive Form umgewandelt. Diese wird durch Atg7 und Atg3 auf PE übertragen. An dieser Reaktion ist der Atg12-Atg5-Atg16-Komplex beteiligt. An PE gebundenes LC3 ist membranständig.

1.1.1.3.2.3 Humane Proteine der Atg8-Familie

Die humanen Homologe der Atg8-Familie gliedern sich in zwei Untergruppen, die Proteine der *Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3* (MAP1LC)-Familie und die der *γ-aminobutyrate type A receptor-associated protein* (GABARAP)-Familie.

Die MAP1LC3-Familie besteht aus drei Proteinen, MAP1LC3A (oder LC3A), MAP1LC3B (oder LC3B) und MAP1LC3C (oder LC3C). Die GABARAP-Familie besteht aus drei Proteinen, GABARAP, *Glandular epithelial cell protein 1* (Gec1 oder GABARAPL1) und dem *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa* (GATE16 oder GABARAPL2). Außerdem gibt es das nur als Pseudogen existierende GABARAPL3 [61, 63, 64].

Das zuerst beschriebene und am besten untersuchte Protein der MAP1LC3-Familie ist LC3B, das zuerst als ein Bindungspartner für Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP), das deren Bindung reguliert, identifiziert wurde [65, 66]. Erst im Jahr 2000 wurde die Beteiligung von LC3B an der Makroautophagie beschrieben [47].

Ähnliches gilt für die Proteine der GABARAP-Familie. GABARAP wurde zu Beginn als ein Bindungspartner von γ -Aminobuttersäure-(GABA)-Typ A-Rezeptoren identifiziert [67], deren Transport entlang des Zytoskeletts zur Zellmembran reguliert [68-70]. Diese Bindung wurde ebenso für Gec1 nachgewiesen [71, 72]. Beide Proteine interagieren auch mit anderen Membranproteinen und Rezeptoren [73-76]. Für GABARAP wurde auch eine Bindung mit Clathrin [77] und Calreticulin [78] nachgewiesen. GATE16 (wie später auch für GABARAP und Gec1 gezeigt), interagiert mit dem *N-ethylmaleimide sensitive factor* (NSF)-Protein [70, 72, 79]. GATE16 vermittelt dessen Interaktion mit *soluble NSF attachment receptor* (SNARE)-Proteinen des Golgi-Apparats, wodurch GATE16 ein wichtiger Faktor für den Proteintransport innerhalb des Golgi-Apparats ist. Für die Proteine der GABARAP-Familie wurde jeweils, wie für die der MAP1LC3-Familie, eine Interaktion mit Tubulin festgestellt [80, 81].

Unterschiede zwischen den beiden Familien bestehen auch in ihrer Funktion während der Makroautophagie. Während die Proteine der MAP1LC3-Familie zu einem frühen Zeitpunkt für die Reifung und den Transport der wachsenden Phagophore verantwortlich zeichnen, koordinieren die Proteine der GABARAP-Familie die Fusion der Phagophore zum Autophagosom. Ebenso rekrutieren sie den ULK1/2-Komplex zur Phagophore, durch den die Makroautophagie initiiert wird [63, 82, 83]. Mitglieder beider Familien können über Adapterproteine wie Sequestosom1 (SQSTM1)/p62 [84], *Antigen nuclear dot 52 kDa protein* (NDP52) [85, 86] oder Optineurin [87, 88] zu Ubiquitin, ubiquitinylierte (und damit zum Abbau markierte) Proteine für den lysosomalen Abbau durch Makroautophagie rekrutieren. Zusammengefasst werden die Funktionen der Atg8-Homologe in Abbildung 7.

Das Expressionsmuster der unterschiedlichen Proteine der MAP1LC3- und der GABARAP-Familie variiert zwischen verschiedenen Geweben [89].

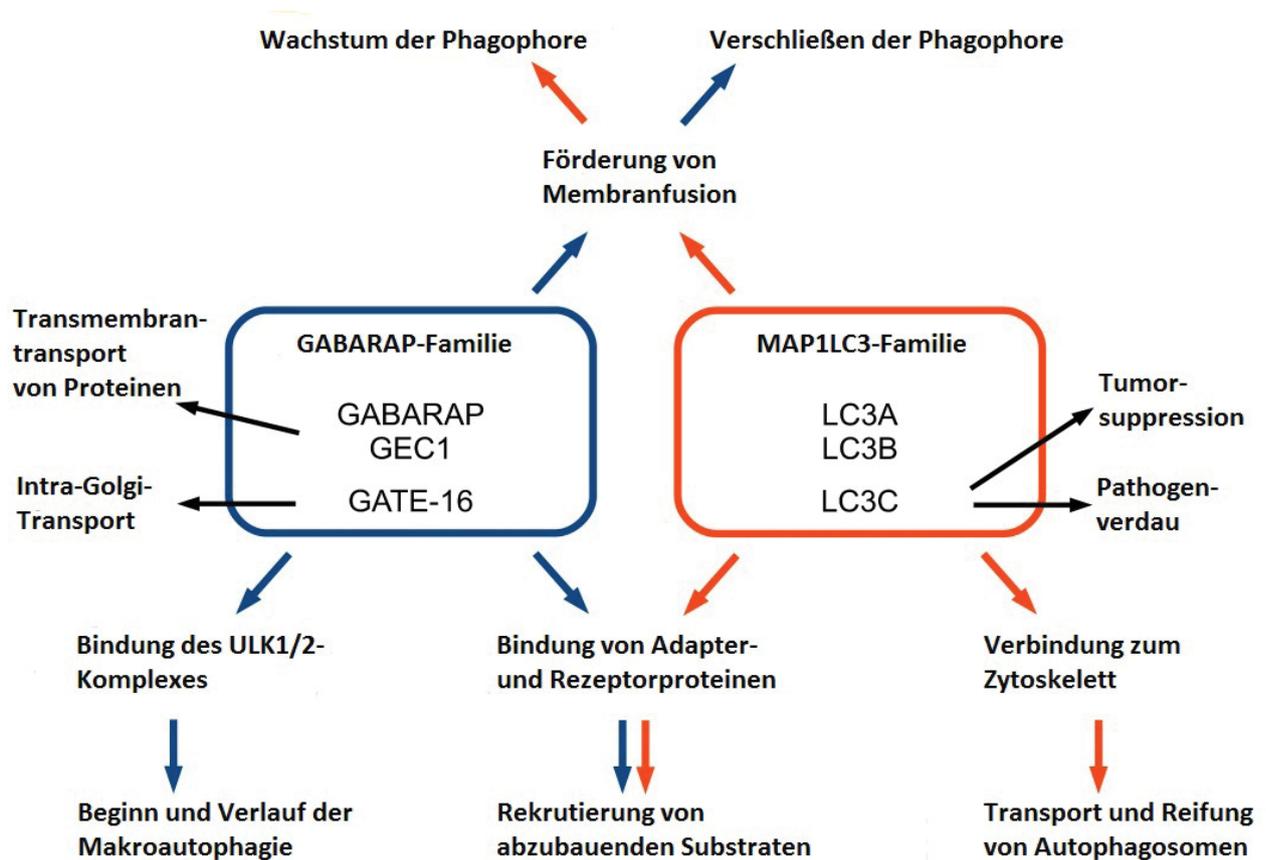


Abb. 7) Funktionen der Proteine der GABARAP- und LC3-Familie (modifiziert nach [63]). Die Funktionen der Proteine der GABARAP- und LC3-Familie und ihre jeweilige Relevanz für die Vorgänge bei der Makroautophagie sind in Blau (für die GABARAP-Familie) und Orange (für die LC3-Familie) dargestellt. Die schwarzen Pfeile geben Funktionen der beiden Familien und ihrer Mitglieder außerhalb der Makroautophagie an.

1.2 Regulation der Makroautophagie

Wegen der Relevanz der Makroautophagie für das Überleben der Zelle unter verschiedensten Bedingungen (s.o.) wird sie durch zahlreiche Signalwege reguliert und kontrolliert. Einige davon werden in diesem Kapitel vorgestellt.

1.2.1 Der Insulinrezeptor-Signalweg

Wie bereits erwähnt, wird die Makroautophagie durch verschiedene Faktoren reguliert. Einer dieser Faktoren ist das Hormon Insulin [90] (ebenso wie sein Antagonist Glucagon [91]). Insulin bindet an den Insulinrezeptor (IR), eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, deren Autophosphorylierung durch diese Bindung aktiviert wird. Das wiederum bewirkt die Aktivierung des *Insulin receptor substrate 1* (IRS-1)-Proteins, was eine Klasse I-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃) anregt. PIP₃ aktiviert wiederum eine Phosphoinositid-abhängige Kinase (*Phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1)), die die Kinase Proteinkinase B (PKB bzw. Akt) phosphoryliert und damit aktiviert.

Durch die Aktivität von Akt wird die Heterodimerbildung der Proteine *Tuberous sclerosis complex 1* (Tsc1) und Tsc2 verhindert. Dadurch kann die Inhibition von *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) durch den Tsc1/Tsc2-Komplex nicht mehr aufrechterhalten werden und Rheb kann seine Funktion als Aktivator der Kinase *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) wahrnehmen [90, 92-96]. Dieses Protein bildet in Verbindung mit *Regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor) und *mammalian lethal with SEC13 protein 8* (mLST8) den mTOR-Komplex 1 (mTORC1) [97, 98], der an einer Schlüsselstelle in der Makroautophagieregulation steht. mTORC1 ist ein Inhibitor des an der Initiation der Makroautophagie beteiligten ULK1/2-Komplexes [99]. Die Vorgänge bei der Signaltransduktion über den IR-Signalweg sind in Abb. 8 schematisch zusammengefasst.

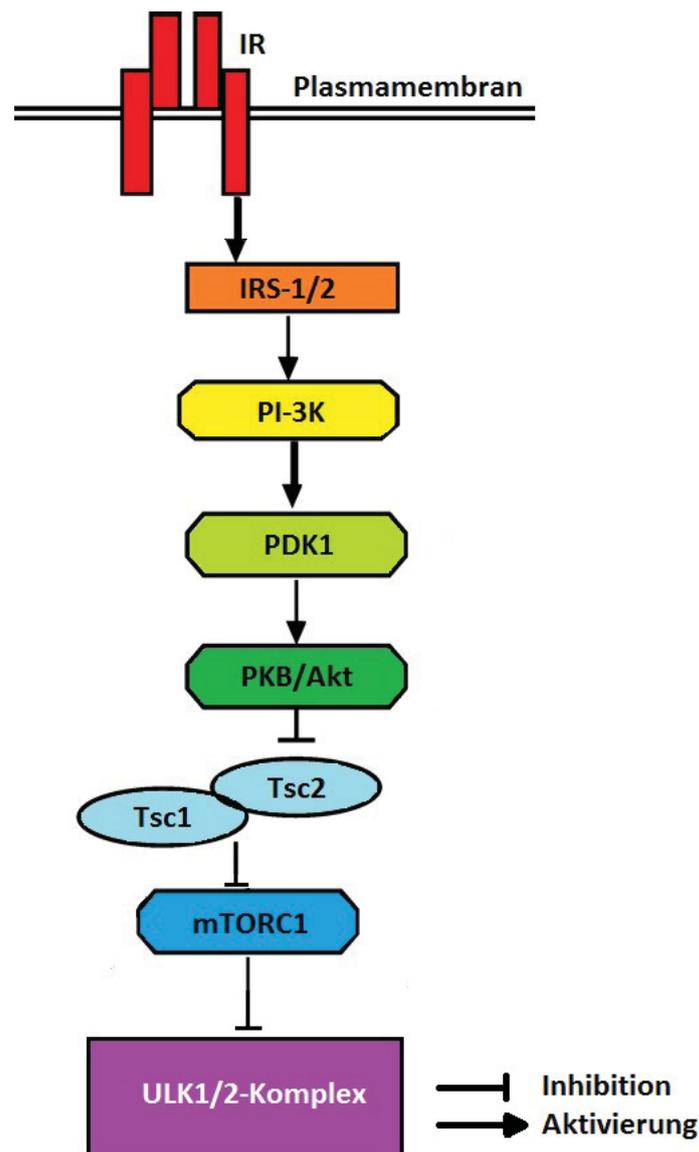


Abb. 8) Der Insulin-Rezeptor (IR)-Signalweg (modifiziert nach [100]). Durch Aktivierung des Insulinrezeptors wird die Makroautophagie inhibiert. Durch die Bindung von Insulin ausgelöste Autophosphorylierung des Insulinrezeptors aktiviert IRS-1. Dieses wiederum aktiviert die von einer Klasse I-PI-3K katalysierte Reaktion von PIP₂ zu PIP₃. PIP₃ aktiviert PDK1, welche PKB/Akt phosphoryliert. So aktivierte PKB/Akt verhindert durch Phosphorylierung die Bildung des Tsc1-Tsc2-Komplexes, welcher mTORC1 inhibieren würde. mTORC1 inhibiert den ULK1/2-Komplex und damit die Initiation der Makroautophagie.

1.2.2 Der AMPK-Signalweg

Die Makroautophagie kann nicht nur durch Wachstumsfaktoren, sondern auch durch den Energiestatus der Zelle (z.B. Verhältnis von Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosintriphosphat (ATP) oder Verhältnis Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP [101], die Anwesenheit von zellulären Grundbausteinen (z.B. Aminosäuren [30]) oder Nährstoffen (z.B. Glukose [102]) gesteuert werden. Hierbei spielt die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) eine zentrale Rolle [95]. Bei Aktivierung kann diese verschiedene Zielproteine phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung von Tsc2 und Raptor wird mTORC1 inaktiviert, was eine Aktivierung der Makroautophagie zur Folge hat [101-104]. Zusätzlich kann AMPK, unabhängig von mTORC1, den ULK1/2-Komplex direkt phosphorylieren und damit die Initiation der Makroautophagie veranlassen [105-107]. In Abb. 9 sind diese Vorgänge schematisch zusammengefasst.

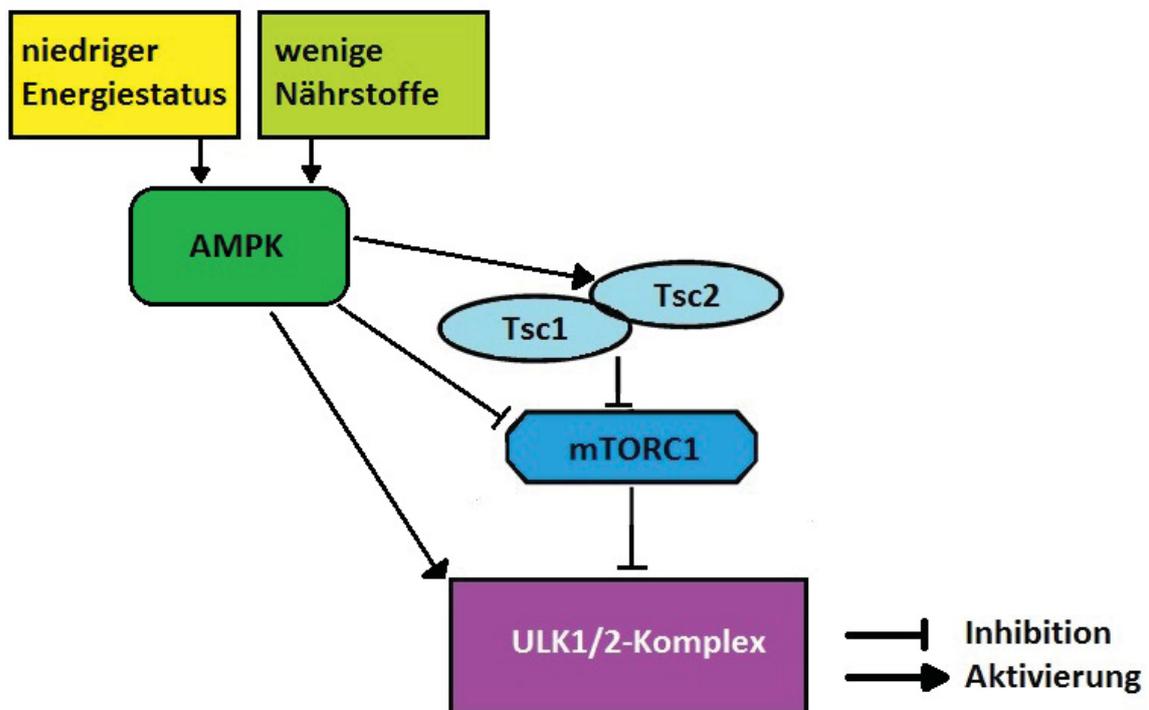


Abb. 9) Der AMPK-Signalweg (modifiziert nach [100, 104]). Ein niedriger Energiestatus (vermittelt durch ein hohes AMP/ATP- oder ADP/ATP-Verhältnis) und der Mangel an Nährstoffen aktivieren die AMPK, die ihrerseits die Initiation der Makroautophagie auslöst, indem sie die Bildung des Tsc1-Tsc2-Komplexes aktiviert. Außerdem kann die AMPK den ULK1/2-Komplex direkt durch Phosphorylierung aktivieren. Eine Phosphorylierung von mTORC1 führt zu dessen Inhibition, was wiederum die Aktivierung des ULK1/2-Komplexes und somit die Makroautophagieinduktion bewirkt.

1.2.3 Der Ras/Raf-Signalweg

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Makroautophagie besteht durch den *Rat sarcoma* (Ras)/*Rat fibrosarcoma* (Raf)-Signalweg. Durch die Autophosphorylierung einer

Rezeptor-Tyrosin-Kinase wird das Ras-Protein mit Guanosin triphosphat (GTP) beladen und dadurch aktiviert. Es bindet in der GTP-gebundenen Form an das Raf-Protein, welches eine Kinasefunktion besitzt, die durch die Bindung an Ras aktiviert wird. Durch Raf wird die Kinase *Mitogen-activated protein kinase/Extracellular-signal regulated Kinase* (MEK) phosphoryliert und damit aktiviert, welche wiederum die Kinase *Extracellular-signal regulated kinase 1/2* (Erk1/2) durch Phosphorylierung aktiviert. Diese kann in ihrer aktivierten Form zahlreiche Proteine phosphorylieren, z.B. den Tsc1/2-Komplex (was zur Inhibition der Komplexbildung führt) oder mTORC1 (was zur Aktivierung von mTORC1 führt) [108-110]. Ras aktiviert zudem die bereits erwähnte Klasse I PI-3K [111]. Der Ras/Raf-Signalweg ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

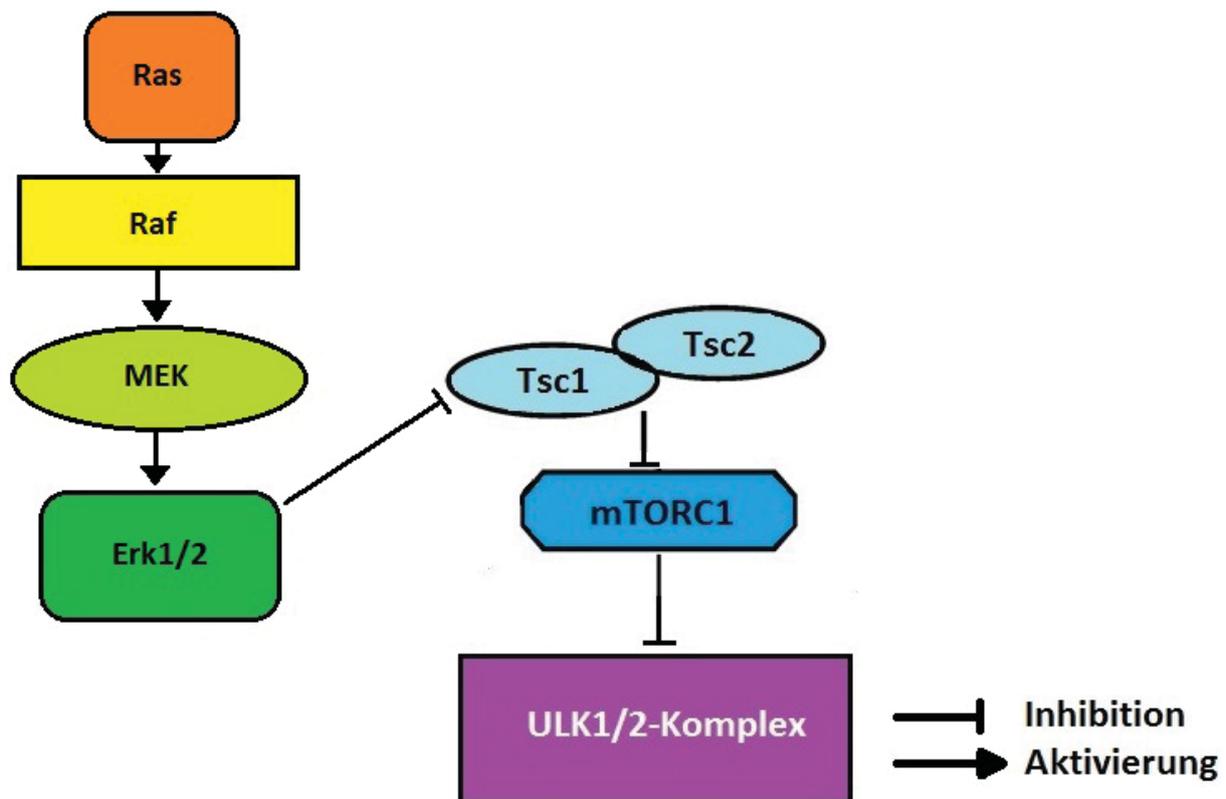


Abb. 10) Der Ras/Raf-Signalweg. Die Aktivierung des Ras-Proteins führt zu einer Aktivierung von mTORC1. Aktiviertes Ras-Protein, phosphoryliert die Raf-Kinase, welche ihrerseits die MEK durch Phosphorylierung aktiviert. MEK kann nun Erk1/2 phosphorylieren. Diese inhibiert die Komplexbildung von Tsc1 und Tsc2, wodurch mTORC1 aktiviert und der ULK1/2-Komplex inhibiert wird. Somit wird die Initiation der Makroautophagie inhibiert.

1.3 Phosphatasen in der Makroautophagie-Regulation

In diesem Kapitel sind einige in der Makroautophagie-Regulation wichtige Phosphatasen beschrieben. Außerdem sollen einige der Modulatoren dieser Phosphatasen vorgestellt werden. Die Stellen, an denen die Phosphatasen die Signalwege regulieren können, sind in Abb. 11 und 12 schematisch dargestellt.

1.3.1 Proteinphosphatase 2A

Proteinphosphatase 2A (PP2A) besteht aus einem dimeren Kernkomplex, der von einer katalytischen Untereinheit mit einer Größe von 36 kDa (C-Untereinheit) und einer regulatorischen Untereinheit mit einer Größe von 65 kDa (A-Untereinheit) gebildet wird. Dieser Komplex wird durch eine dritte Untereinheit (B-Untereinheit) ergänzt, welche ein Protein aus einer von vier Unterfamilien darstellt [112, 113]. Die Zusammensetzung aus den Untereinheiten hat Einfluss auf die Regulation, die Spezifität und die Lokalisation von PP2A in der Zelle [114-116]. Die verschiedenen Formen der heterotrimeren PP2A werden vor allem durch die große Anzahl verschiedener B-Untereinheiten bestimmt. Von der katalytischen C-Untereinheit gibt es bei Säugern nur zwei verschiedene Formen, die zu 97% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen [117]. Die Sequenz der PP2A-C-Untereinheit ist im Organismenreich hochgradig konserviert [118]. Ähnliches trifft auf die A-Untereinheit zu, von der in Säugern ebenfalls lediglich zwei Isoformen existieren, die sich stark ähneln [119]. In der Zelle hat PP2A vielfältige Funktionen. Es dient der Regulation in verschiedenen Signalwegen und kann unterschiedliche Proteine dephosphorylieren [120]. Hier soll insbesondere auf die Dephosphorylierung von PKB/Akt [121] und MEK [122] durch PP2A hingewiesen werden, da PP2A in diesem Zusammenhang Proteine inaktiviert, die in direktem Zusammenhang mit der Regulation der Makroautophagie stehen. Eine Fehlfunktion oder -regulation der PP2A kann in zahlreichen weit verbreiteten Krankheitsbildern wie der Alzheimer-Demenz oder Krebs beobachtet werden [123, 124], was die Bedeutung der PP2A für die Zelle und den Organismus unterstreicht.

1.3.2 PTEN

Die Phosphatase *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN) ist ein Protein mit einer Größe von 47 kDa, das in vielen Krebsarten häufig verändert vorliegt [125, 126]. Das Protein besteht aus drei Domänen [127], einer N-terminalen, katalytischen Phosphatasedomäne, einer C2-Domäne, die an der Bindung von PTEN an die Zellmembran beteiligt ist [128] und eine C-terminale *post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor and zonula occludens-1 protein* (PDZ)-Domäne, die die Bindung von PTEN an andere Proteine mit PDZ-Domäne vermittelt, wodurch die Effekte von PTEN verstärkt werden [129].

PTEN ist sowohl eine Protein- als auch eine Lipidphosphatase [130], wobei die Phosphataseaktivität gegenüber Lipiden, insbesondere PIP_3 , deutlich begünstigt ist [131]. Die Dephosphorylierung von PIP_3 zu PIP_2 durch PTEN ist die umgekehrte Reaktion der durch die Klasse I-PI-3K vermittelten Reaktion (siehe Kapitel 1.2.1). Das macht PTEN zu einem „Gegenspieler“ der Klasse I-PI-3K. Eine Aktivierung von PTEN führt somit zu einer Reduzierung von PIP_3 und damit zu einer Verminderung der Aktivierung der im IR-Signalweg nachfolgenden Proteine (PDK1, PKB/Akt, mTOR). PTEN kann somit eine Rolle bei der Aktivierung der Makroautophagie spielen.

Zu den Krankheiten, die bei einer Veränderung von PTEN auftreten, gehören neben Brust-, Prostata-, Gehirn- oder Schilddrüsentumoren [126] zahlreiche mit Krebs assoziierte Syndrome wie u.a. das Cowden-Syndrom [132], die Lhermitte-Duclos-Krankheit [133] oder das Bannayan-Zonana-Syndrom [134]. Auch eine Beteiligung von PTEN an der Parkinson-Erkrankung wird diskutiert [135, 136].

1.3.3 PTP1B

Proteintyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) war die erste gereinigte Proteintyrosin-Phosphatase (PTP) [137], und ist Mitglied einer Proteinfamilie mit über 100 Mitgliedern [138]. PTP1B ist ein knapp 50 kDa großes Protein², bestehend aus mehreren Domänen. Die N-terminale Domäne vermittelt die katalytische Aktivität des Enzyms [139], die hydrophobe C-terminale Domäne verankert das Protein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums [140]. Die beiden Domänen werden von einer Prolin-reichen Sequenz verbunden, die die Bindung zu Proteinen vermittelt, die eine Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne enthalten [141]. Durch Abspaltung des C-Terminus kann PTP1B auch in andere Regionen der Zelle gelangen und wird aktiviert [142].

PTP1B dephosphoryliert u.a. den aktivierten Insulinrezeptor [143, 144] und kann somit an einer sehr frühen Position den IR-Signalweg inhibieren [145] und somit auch die Makroautophagie beeinflussen. *In vivo* scheint es allerdings Kontrollmechanismen zu geben, die einen Ausfall von PTP1B zumindest teilweise kompensieren können [146].

Eine Störung in der Funktion von PTP1B hängt mit zahlreichen Symptomen zusammen, von denen vor allem Fettleibigkeit, Diabetes und Krebs eine große gesamtgesellschaftliche Relevanz haben. Ein Verlust des Gens für PTP1B führt zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Insulin und erhöhter Resistenz gegen Übergewicht [147, 148]. Auch ein Zusammenhang mit Brust- [149] oder Darmkrebs [150] besteht.

1.3.4 SHP2

Die Proteintyrosin-Phosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2* (SHP2) besteht aus zwei N-terminalen Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen, einer katalytischen Domäne und einer regulatorischen C-terminalen Domäne [151, 152]. Sie kommt in allen Zellen vor [151, 153] und ist ein Protein von 68 kDa Größe.

SHP2 dephosphoryliert Proteine, die den Ras/Raf-Signalweg regulieren, wodurch Ras aktiviert wird (siehe auch Abb. 12) [154, 155]. Verschiedene Studien zur Wirkung von SHP2 im IR-Signalweg [156-160] zeigen jedoch, dass SHP2 - abhängig vom Zelltyp, dem Rezeptor und dem Signalweg - sowohl positive als auch negative Effekte auf die Aktivierung von Signalwegen haben kann [161].

Fehlfunktionen von SHP2 wurden in zahlreichen Fällen des Noonan-Syndroms [162] und beim LEOPARD-Syndrom [163] beobachtet. Ebenso wie mit erniedrigter Empfindlichkeit gegenüber Insulin [156] stehen solche Fehlfunktionen in Zusammenhang mit verschiedenen Formen von Leukämie [164-166].

² <http://www.uniprot.org/uniprot/P18031>

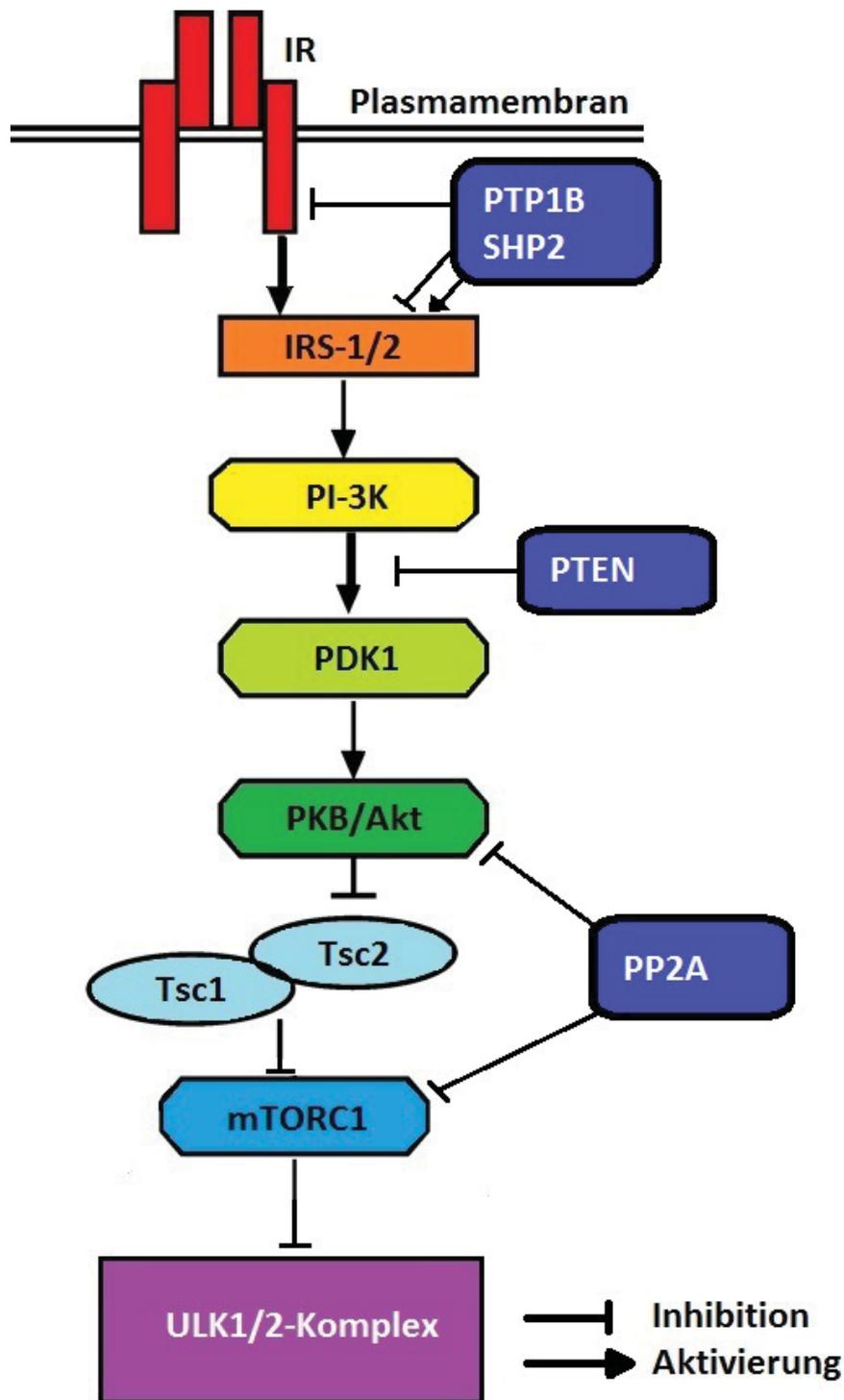


Abb. 11) Regulation des IR-Signalwegs durch Phosphatasen. An verschiedenen Stellen im IR-Signalweg können Phosphatasen eingreifen und die Aktivität von beteiligten Proteinen modulieren. So greifen PTP1B oder SHP2 sehr früh in den Signalweg ein, PP2A relativ spät und PTEN dazwischen. PTP1B wirkt der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors entgegen, was zur Induktion der Makroautophagie führt. SHP2 kann Zelltyp- oder Rezeptortyp-abhängig IRS1 oder IRS2 durch Dephosphorylierung aktivieren oder inhibieren und dementsprechend die Makroautophagieinduktion aktivieren oder inhibieren. PTEN macht die von der Klasse I-PI-3K katalysierte Reaktion von PIP_2 zu PIP_3 rückgängig und aktiviert dadurch die Makroautophagieinduktion. Neben zahlreichen anderen Proteinen dephosphoryliert PP2A PKB/Akt und mTORC1, was jeweils zur Aktivierung der Makroautophagieinduktion führt.

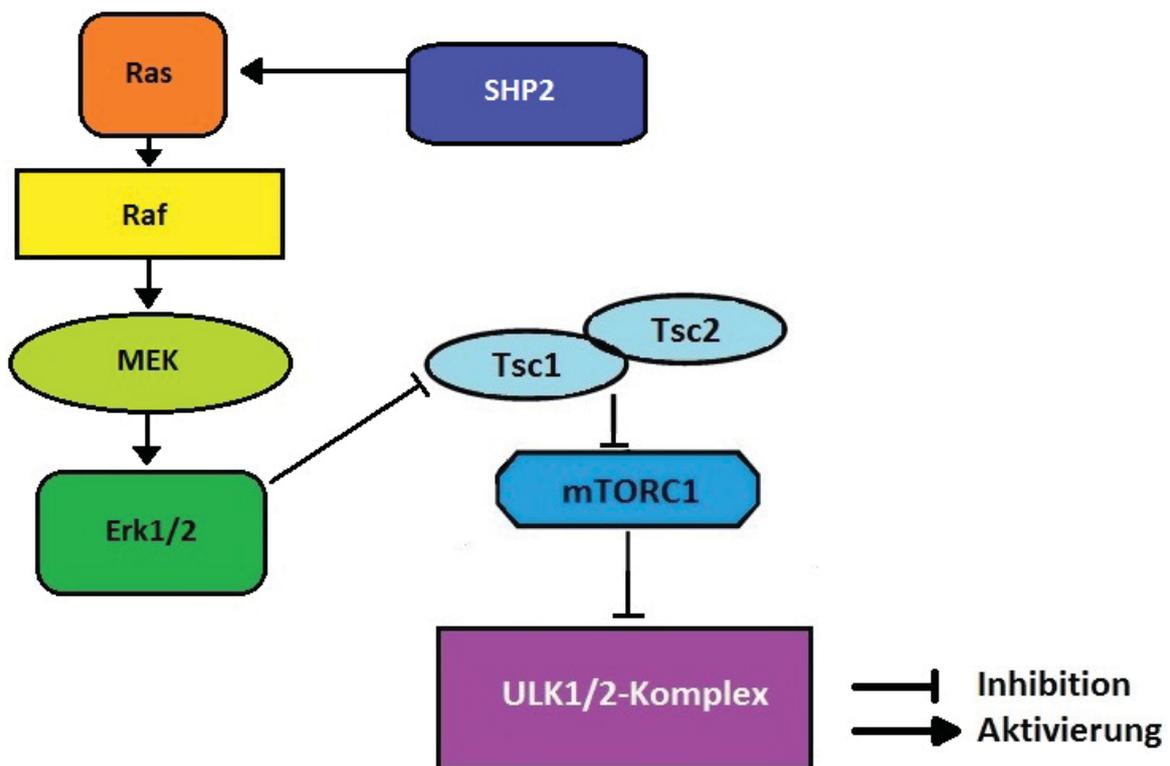


Abb. 12) Regulation des Ras/Raf-Signalwegs durch SHP2. Durch die Aktivierung von SHP2 kann Ras aktiviert werden. Das G-Protein Ras wird durch die die Phosphatase SHP2 inhibiert. Dadurch kommt zur Inhibition des Ras/Raf-Signalwegs, so dass mTORC1 nicht inhibiert wird. Daher kann der ULK1/2-Komplex die Initiation der Autophagie aktivieren.

1.4 Phosphatasemodulatoren

Schon früh in der Forschung zum Einfluss von Phosphatasen auf den Stoffwechsel und die Homöostase der Zelle wurden Modulatoren gefunden, die Phosphatasen inhibieren oder aktivieren können [167]. Daher wird sich dieses Kapitel einer kurzen Beschreibung von verschiedenen Phosphatasemodulatoren widmen. In Abb. 13 sind die Strukturen und der chemische Aufbau der Modulatoren zusammengefasst dargestellt.

1.4.1 bpV(OH)pic

Eine bereits früh entdeckte Gruppe von Inhibitoren von PTPs stellen Vanadatverbindungen dar, die das aktive Zentrum der PTPs reversibel, kompetitiv blockieren [168, 169]. Insbesondere Bisperoxovanadat-Verbindungen wurden zur Inhibition von PTPs [170, 171] oder als Insulinmimetika [172] eingesetzt. Weil das aktive Zentrum der PTPs und von PTEN sehr ähnlich ist, wurden Vanadatverbindungen auch auf ihre Wirkung auf die Aktivität von PTEN hin untersucht, wobei gegenüber den PTPs eine deutlich niedrigere Konzentration zur halbmaximalen Inhibition (IC50) festgestellt werden konnte (niedriger nM-Bereich),

insbesondere für Dikalium-bisperoxo-(5-hydroxypyridin-2-carboxyl)-oxovanadat (bpV(OH)pic) [173].

In Abb. 13 A findet sich die Struktur von bpv(OH)pic.

1.4.2 Calyculin A

Calyculine sind eine Gruppe von natürlich vorkommenden Stoffen, die zuerst aus dem Meeresschwamm *Discodermia calyx* isoliert werden konnten [174]. Calyculin A wurde daraufhin als ein wirksamer Inhibitor (IC50 im niedrigen nM-Bereich) für PP2A identifiziert [167], der durch seine inhibitorische Wirkung auf PP2A die Bildung von Tumoren begünstigen kann [175].

Die Struktur von Calyculin A ist in Abb. 13 B dargestellt.

1.4.3 Ceramid C6

Ceramide sind eine Gruppe von Membranlipiden, die aus einem Sphingosin und einer Fettsäure bestehen [176]. Neben ihrer Funktion bei Aufbau von Membranen wurden auch Funktionen als Botenstoff innerhalb der Zelle festgestellt. So spielen Ceramide u.a. eine Rolle beim programmierten Zelltod durch Apoptose [177], ausgelöst z.B. durch Stress [178] wie bspw. Strahlung [179].

Ceramid C6 wurde neben anderen Ceramiden als ein Aktivator der heterotrimeren PP2A identifiziert [180].

Die Struktur von Ceramid C6 findet sich in Abb. 13 C.

1.4.4 Cypermethrin

Das in der Landwirtschaft als Insektengift eingesetzte Cypermethrin ist ein Klasse-II Pyrethroid [181], das vor allem gegen stechende oder saugende Insekten eingesetzt wird.

Es steht im Verdacht Parkinson-Symptome auslösen zu können [182-184].

Cypermethrin ist ein Inhibitor der Phosphatase Calcineurin (oder Proteinphosphatase 2B), die große Ähnlichkeit mit PP2A hat [185] und an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt ist [186].

Die Struktur von Cypermethrin ist in Abb. 13 D dargestellt.

1.4.5 Ethyl-3,4-dephostatin

Dephostatin wurde als ein PTP-Inhibitor aus *Streptomyces*-Stämmen gewonnen [187]. Da sich Dephostatin in Zellkulturmedien als instabil erwies, wurde an der Gewinnung von Derivaten gearbeitet, die stabiler und ebenso aktiv gegen PTPs sind [188]. Mit Ethyl-3,4-dephostatin konnte ein solcher Stoff gewonnen werden, der insbesondere die Funktion von PTP1B inhibiert und antidiabetische Effekte zeigt [189].

In Abb. 13 E findet sich die Struktur von Ethyl-3,4-dephostatin.

1.4.6 Fostriecin

Das in den frühen 1980er-Jahren als Antitumor-Antibiotikum aus *Streptomyces pulveraceus* gewonnene Fostriecin [190] zeichnet sich durch seine hohe Spezifität gegenüber PP2A aus. Während es PP2A in Konzentrationen im niedrigen nMol-Bereich effektiv inhibiert, ist es gegen Proteinphosphatase 1 nur im hohen μM -Bereich aktiv; gegen Calcineurin konnte keine Wirkung nachgewiesen werden [191].

Eine Darstellung des Fostriecin-Moleküls findet sich in Abb. 13 F.

1.4.7 NaSb-Gluconat

Das zur Behandlung von Leishmaniose eingesetzte Natriumantimonogluconat [192] besitzt eine inhibitorische Wirkung gegen mehrere PTPs. Die stärkste Wirkung (IC_{50} im niedrigen μM -Bereich) zeigt sich gegen die Phosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1* (SHP1), die eng mit SHP2 verwandt ist [193]. Bei etwa zehnfach höherer Konzentration ist NaSb-Gluconat auch gegenüber SHP2 und PTP1B aktiv [193].

Die Struktur von NaSb-Gluconat ist in Abb. 13 G dargestellt.

1.4.8 Okadainsäure

Ähnlich wie Calyculin A wurde Okadainsäure als ein Inhibitor der PP2A identifiziert [167]. Zuerst wurde es aus dem Meeresschwamm *Halichondria okadai* isoliert [194]. Auch andere *Halichondria*-Arten und Dinoflagellaten produzieren Okadainsäure [195].

Zusätzlich zu PP2A ist Okadainsäure ein Inhibitor von Proteinphosphatase 1 [196, 197]. Durch seine Wirkung hat Okadainsäure einen tumorigenen Effekt und übt Insulin-ähnliche Effekte auf die Zelle aus [198].

In Abb. 13 H ist die Struktur von Okadainsäure dargestellt.

1.4.9 2-Bromo-4'-methoxyphenon

Bei der Entwicklung von PTP-Inhibitor-Molekülen durch Variation der funktionellen Gruppen konnte u.a. 2-Bromo-4'-methoxyphenon (PTP-Inhibitor II) als ein PTP-Inhibitor identifiziert werden [199]. Dieser Inhibitor ist aktiv gegen SHP1 und PTP1B und kann somit in die Regulation des IR- und des Ras/Raf-Signalweges eingreifen [199, 200].

Seine Struktur ist in Abb. 13 I zu finden.

1.4.10 Tautomycetin

Tautomycetin ist ein Derivat des in *Streptomyces spiroverticillatus* vorkommenden Tautomycin [201]. Während Tautomycin ein Inhibitor von PP2A und Proteinphosphatase 1 ist [202], wirkt Tautomycetin spezifisch gegen Proteinphosphatase 1 [203]. Durch den Einsatz von Tautomycetin konnte Proteinphosphatase 1 als ein Aktivator von Ras1 identifiziert werden [204]. Mit SHP2 konnte eine weitere Phosphatase als Ziel für

Tautomycetin bestimmt werden [205]. Genutzt wird Tautomycetin als Immunsuppressor z.B. nach Transplantationen [206].

Die Struktur von Tautomycetin ist in Abb. 13 J dargestellt.

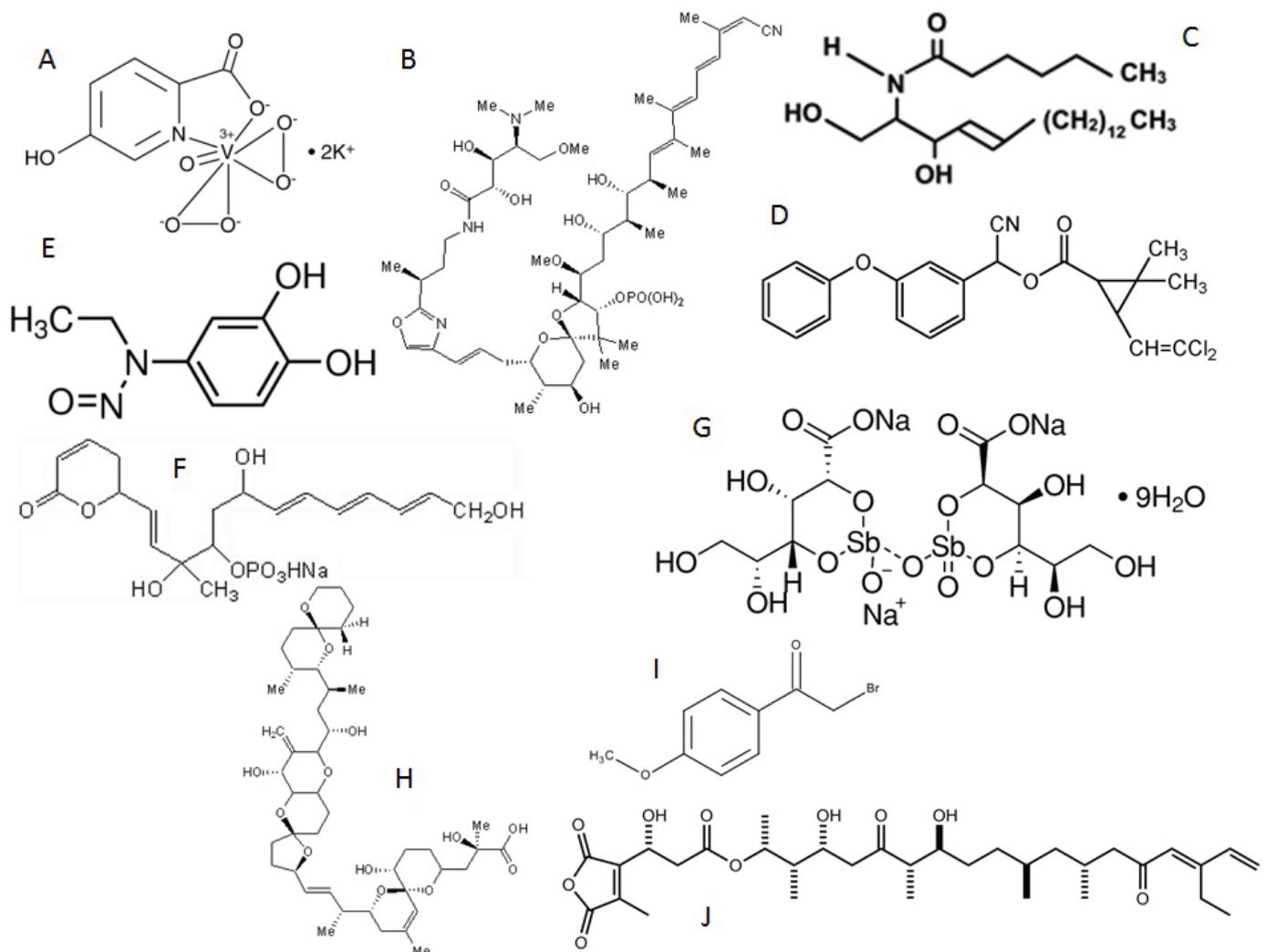


Abb. 13) Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Phosphatasemodulatoren. A: bpV(OH)pic, B: Calyculin A, C: Ceramid C6, D: Cypermethrin, E: Ethyl-3,4-dephostatin, F: Fostriecin, G: NaSb-Gluconat, H: Okadainsäure, I: PTP-Inhibitor II, J: Tautomycetin

1.5 Regulation der Makroautophagie durch Phosphatasen mit Fokus auf neuronale Zellen

Die Relevanz der Mechanismen der Autophagie für den Organismus zeigt sich bereits in der Vielfalt der Krankheiten und Symptome, die bei Störung der Autophagie auftreten. Autophagie spielt, wie bereits erwähnt, eine Rolle bei Krebs, Übergewicht und Diabetes, der Alzheimer-Demenz, Morbus Parkinson, Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis oder Lungenentzündungen, bei Alterungsprozessen und bei zahlreichen erblichen Syndromen (z.B. Noonan-Syndrom). Insgesamt entsteht durch diese Krankheiten nicht nur ein hoher volkswirtschaftlicher Schaden, sondern auch ein hohes Maß an Schmerz und persönlichem

Leid. Eine detaillierte Aufklärung der Prozesse, die bei der Autophagie ablaufen, ist daher äußerst wünschenswert.

Während der Einfluss von Kinasen auf die Regulation der Autophagie in der Vergangenheit große Beachtung fand und immer noch findet, steht die Forschung zur Rolle der Phosphatasen in der Autophagieregulation erst am Anfang. Für viele Proteine, die Effekte auf die Autophagie haben, sind Phosphorylierungen oder potentielle Phosphorylierungsstellen (sowie die verantwortlichen Kinasen) bekannt. Wie und durch welche Phosphatasen diese Phosphorylierungen rückgängig gemacht werden können und welche Auswirkungen das hat, ist in vielen Fällen unbekannt.

Weiterhin waren die wenigen Untersuchungen, die bisher zur Beteiligung von Phosphatasen an der Autophagieregulation durchgeführt wurden, auf nicht-neuronale Zellen beschränkt. Insbesondere die Mechanismen der Autophagie, die zur Entstehung der Alzheimer-Demenz oder des Morbus Parkinson beitragen bzw. die Symptome lindern können, sind noch immer nicht gut verstanden. Diese Informationen können nur durch Forschung an neuronalen Zellen erarbeitet werden.

Ein Beitrag dazu soll mit dieser Arbeit geleistet werden, indem der Einfluss einiger Phosphatasen auf autophagische Prozesse in neuronalen Zellen näher untersucht und charakterisiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In diesem Kapitel sind die Materialien aufgelistet, die für die Versuche eingesetzt wurden.

2.1.1 Verbrauchsmaterial

2.1.1.1 Verbrauchsmaterial in der Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Verbrauchsmaterialien werden in Tabelle (Tab.) 1 aufgelistet.

2.1.1.2 Verbrauchsmaterial im Labor (außer Zellkultur)

Die im Labor verwendeten Verbrauchsmaterialien werden in Tab. 2 aufgelistet.

2.1.2 Geräte

2.1.2.1 Geräte in der Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Geräte werden in Tab. 3 aufgelistet.

2.1.2.2 Geräte in Labor (außer Zellkultur)

Die im Labor verwendeten Geräte werden in Tab. 4 aufgelistet.

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Medien in der Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Medien und Medienzusätze sind in Tab. 5 aufgelistet.

2.1.3.2 Chemikalien in der Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Chemikalien sind in Tab. 6 aufgelistet.

2.1.3.3 Chemikalien im Labor (außer Zellkultur)

Die im Labor verwendeten Chemikalien sind in Tab. 7 und in Tab. 8 aufgelistet.

2.1.3.4 Puffer und Lösungen

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und aus mehreren Komponenten bestehenden Lösungen tabellarisch aufgelistet. Die Herstellungsanweisungen sind den Tab. 9 bis 27 zu entnehmen. Bei dem zur Pufferherstellung verwendeten Wasser handelt es sich um demineralisiertes, steril filtriertes, autoklaviertes Wasser

2.1.4 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 28 aufgelistet.

2.1.5 Proteine

Die verwendeten Proteine sind in Tab. 29 aufgelistet.

2.1.6 Kleine, interferierende RNS (siRNS)

Die verwendeten kleinen, interferierenden RNS (siRNS) sind in Tab. 30 aufgelistet.

2.1.7 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tab. 31 aufgelistet.

2.1.8 Software

Die zur Aufnahme und Auswertung der Ergebnisse verwendete Software ist in Tab. 32 aufgelistet.

Tab. 1) Verbrauchsmaterial in der Zellkultur

Biosphere Filterspitzen	100 - 1000 µl	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Biosphere Filterspitzen	2 - 100 µl	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Cell star Zellkulturschale	35 mm Ø, 10 mm Ø Vertiefungen	Greiner Bio one	Österreich	Kremsmünster
Glasbodenschälchen	35 mm Ø, 14 mm Ø Vertiefung	Mattek	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
Laborflasche	verschiedene Volumina	Schott	Deutschland	Mainz
Multiwell-Platte	6 Wells	SPL Life Sciences Co.	Südkorea	Gyeonggi-do
Multiwell-Platte	24 Wells	SPL Life Sciences Co.	Südkorea	Gyeonggi-do
Pasteurpipetten	230 mm	Brand	Deutschland	Wertheim
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Reaktionsgefäße	2 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
SafeSeal Pipettenspitzen	0,1 - 2,5 µl	Biozym	Deutschland	Hessisch Oldendorf
Serologische Pipette	2 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Serologische Pipette	5 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Serologische Pipette	10 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Serologische Pipette	25 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Sterile aerosol Pipettenspitzen	20 - 200 µl	Biozym	Deutschland	Hessisch Oldendorf
Zellkulturflasche	25 cm ²	SPL Life Sciences Co.	Südkorea	Gyeonggi-do
Zellkulturflasche	75 cm ²	SPL Life Sciences Co.	Südkorea	Gyeonggi-do
Zellkulturflasche	175 cm ²	SPL Life Sciences Co.	Südkorea	Gyeonggi-do
Zentrifugenröhrchen	15 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	50 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen mit Standboden	50 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht

Tab. 2) Verbrauchsmaterial im Labor (außer Zellkultur)

Becherglas	verschiedene Volumina	Schott	Deutschland	Mainz
Criterion TGX stainfree Gel	26 Taschen	BioRad	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Laborflasche	verschiedene Volumina	Schott	Deutschland	Mainz
Messzylinder	verschiedene Volumina	VitLab	Deutschland	Großostheim
Mini Protean TGX stainfree Gel	10 Taschen	BioRad	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
pH-Indikatorstreifen	verschiedene pH-Bereiche	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Pipettenspitzen	0,1 - 10 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Pipettenspitzen	2 - 200 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Pipettenspitzen	100 - 1000 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Pipettenspitzen	500 - 5000 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Reagent Reservoir	25 ml	VWR	Vereinigte Staaten von Amerika	Pennsylvania
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Reaktionsgefäße	2 ml	Sarstedt	Deutschland	Nümbrecht
Roti-Fluoro PVDF-Membran	0,2 µm Poren	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Rotilabo Mikrottestplatten	96 Wells, F-Profil	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Trans Blot Turbo Transfer Pack	0,2 µm PVDF Midi	BioRad	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Whatman Chromatografie Papier	3 mm	GE Healthcare	England	Buckinghamshire

Tab. 3) Geräte in der Zellkultur

Fluoreszenzmikroskop	IX71	Olympus	Japan	Tokio
Inkubator	CB150	Binder	Deutschland	Tuttlingen
Neubauer Zählkammer		Brand	Deutschland	Wertheim
Pipetboy acu		Integra	Deutschland	Fernwald
Pipette	0,1-2,5 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Pipette	2-20 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Pipette	20-200 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Pipette	100-1000 µl	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Spannungsquelle	U-RFL-T	Olympus	Japan	Tokio
Tischzentrifuge	5702R	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Tischzentrifuge	5418R	eppendorf	Deutschland	Hamburg
Vortex Genie 2		Scientific Industries	Vereinigte Staaten von Amerika	New York
Wärmethermostat	E5A	Julabo	Deutschland	Seelbach

Tab. 4) Geräte im Labor (außer Zellkultur)

ChemiDoc MP	BioRad			Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Gelkammer für Agarose-Gele	Biometra	Compact XS/S		Deutschland	Göttingen
Gelkammer für SDS-Gele	Amersham pharmacia biotech	SE260		England	Buckinghamshire
Heizblock	Stuart Scientific			England	Staffordshire
Kombischüttler	Edmund Bühler GmbH	KL2		Deutschland	Hechingen
Laborwaage	Kern	KB 3600-2N		Deutschland	München
Laser-Scanning-Mikroskop	Zeiss	710		Deutschland	Oberkochen
MilliPAK Filtereinheit	Merck Millipore	0,22 µm Poren		Deutschland	Darmstadt
MilliQ Biocel	Merck Millipore			Deutschland	Darmstadt
pH-Elektrode	Mettler-Toledo	InLab Expert		Deutschland	Gießen
pH-Meter	Mettler-Toledo	MP220		Deutschland	Gießen
Pipette	eppendorf	0,1-2,5 µl		Deutschland	Hamburg
Pipette	eppendorf	2-20 µl		Deutschland	Hamburg
Pipette	eppendorf	20-200 µl		Deutschland	Hamburg
Pipette	eppendorf	100-1000 µl		Deutschland	Hamburg
Pipette	eppendorf	500-5000 µl		Deutschland	Hamburg
Polarstar Optima Plattenreader	BMG Labtech			Deutschland	Offenburg
Polymerasekettenreaktions- Thermocycler	BioRad	iCycler		Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
PowerPac 300	BioRad			Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Rollenmischer	Fröbel Labortechnik	RM5		Deutschland	Lindau
Rotilabo Minizentrifuge	Roth			Deutschland	Karlsruhe
Spannungsquelle	Amersham pharmacia biotech	EPS 1001		England	Buckinghamshire
Tischzentrifuge	eppendorf	5804R		Deutschland	Hamburg
Tischzentrifuge	eppendorf	5415R		Deutschland	Hamburg
TransBlot Turbo	BioRad			Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Vortex Genie 2	Scientific Industries			Vereinigte Staaten von Amerika	New York

Tab. 5) Medien und Medienzusätze in der Zellkultur

Aminosäuren nicht-essentiell	100x	GE Healthcare	England	Buckinghamshire
Dulbecco's Modified Eagle Medium	viel Glukose (4,5g/L), +L- Glutamin	GE Healthcare	England	Buckinghamshire
Dulbecco's Modified Eagle Medium	ohne Phenolrot, ohne Natriumpyruvat	life technologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Fetales Kälberserum		GE Healthcare	England	Buckinghamshire
Fetales Kälberserum		Sigma Aldrich	Vereinigte Staaten von Amerika	Missouri
Hank's gepufferte Salzlösung		GE Healthcare	England	Buckinghamshire
RPMI 1640		GE Healthcare	England	Buckinghamshire

Tab. 6) Chemikalien in der Zellkultur

Bafilomycin A1	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Benzonase	Merck	Deutschland	Darmstadt
bpV(OH)pic	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Calyculin A	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Ceramide C6	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Cypermethrin	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
DharmaFect1	GE Healthcare	England	Buckinghamshire
Dimethylsulfoxid	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Ethyl-3,4-desphostatin	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Fibronectin	Sigma Aldrich	Vereinigte Staaten von Amerika	Missouri
Fostriecin	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Geneticin/G418-Sulfat	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Mycokill AB	GE Healthcare	England	Buckinghamshire
Natriumstibogluconat	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Okadainsäure	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
PCR Mycoplasma Test Kit	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
PolyFect	Qiagen	Niederlande	Venlo
PTP-Inhibitor II	SantaCruz Biotechnologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Texas
Rapamycin	Tocris	England	Bristol
Tautomycetin	Tocris	England	Bristol
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich	Vereinigte Staaten von Amerika	Missouri
Trypsin/EDTA	GE Healthcare	England	Buckinghamshire

Tab. 7) Chemikalien im Labor (außer Zellkultur) (1)

2-Propanol	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Aceton		VWR	Vereinigte Staaten von Amerika	Pennsylvania
Acrylamid 4K-Lösung 29:1	30%	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Ammoniumpersulfat		AMRESCO	Vereinigte Staaten von Amerika	Ohio
β-Mercaptoethanol		Roth	Deutschland	Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz		Merck	Deutschland	Darmstadt
Chloroform	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
complete mini EDTA-freie Proteaseinhibitor-Tabletten	Tabletten	Roche	Schweiz	Basel
Coomassie Brilliant Blue R250		Merck	Deutschland	Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat Dihydrat	p.a.	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	p.a.	Roth	Deutschland	Karlsruhe
DNS-Ladepuffer	6x	Thermo Fischer Scientific	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
Elektrodenreinigungslösung	HI7073	Hanna Instruments	Deutschland	Kehl am Rhein
Essigsäure	100%, p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Ethanol	abs.	VWR	Vereinigte Staaten von Amerika	Pennsylvania
Ethidiumbromidlösung	1%	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Glycin		AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Glycerin	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Kalibrierlösung	HI7007	Hanna Instruments	Deutschland	Kehl am Rhein
Kalibrierlösung	HI7004	Hanna Instruments	Deutschland	Kehl am Rhein
Kalibrierlösung	HI7010	Hanna Instruments	Deutschland	Kehl am Rhein
Kaliumchlorid	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt

Tab. 8) Chemikalien im Labor (außer Zellkultur) (2)

LE Agarose	für	Biozym	Deutschland	Hessisch Oldendorf
Magermilchpulver	Gelelektrophorese	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Methanol	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Micro BCA ProteinbestimmungsKit		Thermo Fisher Scientific	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
Natriumacetat	p.a.	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Natriumchlorid	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Plätzchen, für die Biochemie	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Plätzchen	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Ladder		Thermo Fisher Scientific	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
Rinderserumalbumin Faktor V	Pulver, für die Molekularbiologie	Roth	Deutschland	Karlsruhe
Salzsäure	37%, p.a.	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
SuperSignal West Pico Chemoluminescent Kit		Thermo Fisher Scientific	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
Tetramethylethylenediamin		AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	buffer grade	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Triton X100	für die Biochemie	AppliChem	Deutschland	Darmstadt
Tween20	für die Biochemie	AppliChem	Deutschland	Darmstadt

Tab. 9) Zusammensetzung von 3 M NaCl-Lösung

3 M NaCl (1 l)

175,32 g	NaCl
----------	------

mit Wasser (H₂O) auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Tab. 10) Zusammensetzung von 1 M MgCl₂-Lösung

1 M MgCl₂ (0,5 l)

101,65 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
----------	--

mit Wasser auf 0,5 l auffüllen, autoklavieren

Tab. 11) Zusammensetzung von 0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-HCl-Lösung, pH 6,8

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (1 l)

60,57 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
---------	--

mit Wasser auf 0,9 l auffüllen, pH 6,8 mit HCl einstellen, mit Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Tab. 12) Zusammensetzung von 1,5 M Tris-Lösung, pH 8,8

1,5 M Tris, pH 8,8 (1 l)

181,71 g	Tris
----------	------

mit Wasser auf 0,9 l auffüllen, pH 8,8 mit NaOH einstellen, mit Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Tab. 13) Zusammensetzung von Benzonase-Lösung

Benzonase, 5 mg/ml (20 ml)

100 mg	Benzonase
1 ml	3 M NaCl

mit Wasser auffüllen, unter der Sterilbank steril filtrieren (Filter: 0,22 µm Porendurchmesser)

Tab. 14) Zusammensetzung von vierfach-konzentriertem Laemmli-Puffer

4x Laemmli-Probenpuffer (100 ml)

40% (v/v)	Glyzerin
0,5% (w/v)	Bromphenolblau Natriumsalz
40% (v/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
15% (v/v)	1,5 M Tris pH 6,8
8% (v/v)	β-Mercaptoethanol

Tab. 15) Zusammensetzung von Tris-gepufferter Salzlösung (TBS)

TBS

136 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
24,7 mM	Tris

mit Wasser mischen, pH 7,4 einstellen, Endvolumen einstellen, autoklavieren

Tab. 16) Zusammensetzung von TBS mit Tween20 (TBST)

TBST

0,1% (v/v)	Tween20
------------	---------

mit TBS (1x) mischen

Tab. 17) Zusammensetzung von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)

PBS, pH 7,4, 10x

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	K ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O

mit Wasser mischen, pH 7,4 einstellen, Endvolumen einstellen, autoklavieren

Tab. 18) Zusammensetzung des Lysepuffers für die Zelllyse

Triton-Lysepuffer

50 mM	Tris
150 mM	NaCl
0,3 mM	MgCl ₂
0,5% (v/v)	Triton X100
10% (v/v)	Glyzerin
1x	Proteaseinhibitor
5 µl	Benzonase-Lösung

unter der Sterilbank ansetzen

Tab. 19) Zusammensetzung des Laufpuffers für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer für die SDS-PAGE

25 mM	Tris
250 mM	Glycin
0,5% (v/v)	SDS

mit Wasser auffüllen

Tab. 20) Zusammensetzung des ersten Anodenpuffers (An1) beim Western-Blotting

Anodenpuffer 1 (An1), pH 10,4

0,3 M	Tris
-------	------

mit Wasser mischen, pH 10,4 einstellen, Endvolumen einstellen
vor Gebrauch mit 10% (v/v) Methanol versetzen

Tab. 21) Zusammensetzung des zweiten Anodenpuffers (An2) beim Western-Blotting

Anodenpuffer 2 (An2), pH 10,4

25 mM	Tris
-------	------

mit Wasser mischen, pH 10,4 einstellen, Endvolumen einstellen
vor Gebrauch mit 10% (v/v) Methanol versetzen

Tab. 22) Zusammensetzung des Kathodenpuffers beim Western-Blotting

Kathodenpuffer, pH 9,4

25 mM	Tris
40 mM	Glycin

mit Wasser mischen, pH 9,4 einstellen, Endvolumen einstellen

Tab. 23) Zusammensetzung des Stripping-Puffers

Stripping-Puffer, pH 2,2 (1 l)

15 g	Glycin
1 g	SDS
10 ml	Tween 20

mit Wasser auf 0,9 l auffüllen, pH 2,2 einstellen, mit Wasser auf 1 l auffüllen

Tab. 24) Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung zum Anfärben von Gelen

Coomassie-Färbelösung

25% (v/v)	2-Propanol
1% (v/v)	Essigsäure
0,05% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250

mit Wasser auffüllen

Tab. 25) Zusammensetzung von Sammelgelen

Sammelgel (für 11 Gele)

18,4 ml	Wasser
5,5 ml	Acrylamid 4K-Lösung 29:1
8,4 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
330 µl	10% (w/v) SDS
250 µl	10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
33 µl	Tetramethylethyldiamin (TEMED)

In die Gießkammer geben, Kämme für Geltaschen einstecken, aushärten lassen

Tab. 26) Zusammensetzung von Trenngelen

Trenngel (für 11 Gele)

20,6 ml	Wasser
45 ml	Acrylamid 4K-Lösung 29:1
23,6 ml	1,5 M Tris pH 8,8
900 µl	10% (w/v) SDS
900 µl	10% (w/v) APS
36 µl	TEMED

In die Gießkammer geben, mit 2-Propanol überschichten, aushärten lassen

Tab. 27) Zusammensetzung von Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TEE-Puffer)

Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer

40 mM	Tris
19 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA

Tab. 28) Antikörper

Anti-LC3B antibody	Maus monoklonal	nanotools	Deutschland	Teningen
Anti-PP2A alpha antibody	Kaninchen polyklonal	abcam	England	Cambridge
Anti-PTEN [EPR408-76] antibody	Kaninchen polyklonal	abcam	England	Cambridge
Anti-PTP1B antibody	Kaninchen polyklonal	abcam	England	Cambridge
Anti-SHP2 antibody	Kaninchen polyklonal	abcam	England	Cambridge
Anti-SQSTM1/p62 antibody	Kaninchen polyklonal	abcam	England	Cambridge
Anti-Tubulin antibody	Kaninchen polyklonal	abcam	England	Cambridge
GABARAP Polyclonal Antibody	Kaninchen polyklonal	proteintech	Vereinigte Staaten von Amerika	Illinois
GABARAPL1 Polyclonal Antibody	Kaninchen polyklonal	proteintech	Vereinigte Staaten von Amerika	Illinois
GABARAPL2 Polyclonal Antibody	Kaninchen polyklonal	proteintech	Vereinigte Staaten von Amerika	Illinois

Tab. 29) Proteine

GABARAP	synthetisiert von Peixang Ma	Deutschland	Jülich
MAPLC3B	synthetisiert von Jeannine Mohrlüder	Deutschland	Jülich
p62 Recombinant Protein	ProSci	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien

Tab. 30) siRNS

AllStars Negative Control siRNS	Qiagen	Niederlande	Venlo
AllStars Negative siRNS AF488	Qiagen	Niederlande	Venlo
SignalSilence PTEN siRNS I	Cell Signaling Technology	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
SignalSilence SHP-2 siRNS I	Cell Signaling Technology	Vereinigte Staaten von Amerika	Massachusetts
Silencer Pre-designed Ppp2ca siRNS	life technologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
Silencer Pre-designed Ptpn1 siRNS	life technologies	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien

Tab. 31) Zelllinien

HenriettaLarks (HeLa)	Mensch	DSMZ	Deutschland	Braunschweig
Hepatocellular carcinoma G2 (Hep G2)	Mensch	DSMZ	Deutschland	Braunschweig
Human embryonic kidney 293 (HEK293)	Mensch	DSMZ	Deutschland	Braunschweig
Mouse embryonic fibroblasts (MEF)	Maus	AG Methner	Deutschland	Düsseldorf
Neuro 2A (N2A)	Maus	DSMZ	Deutschland	Braunschweig

Tab. 32) Software

Imagelab	Version 4.0	BioRad	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien
ZEN	2009	Zeiss	Deutschland	Oberkochen
Optima	2.00 R3	BMG Labtech	Deutschland	Offenburg
SigmaPlot	Version 11.0	Systat Software	Vereinigte Staaten von Amerika	Kalifornien

2.2 Methoden

2.2.1 Inkubation von Zellen

Alle Zelllinien wurden, sofern nicht anders angegeben, in einem Brutschrank mit Kohlendioxid (CO₂)-Belüftung inkubiert. Der CO₂-Gehalt der Luft im Inkubator betrug 5% und entspricht damit etwa den Bedingungen, die die Zellen auch *in vivo* vorfinden würden. Das CO₂ dient der Stabilisierung des pH-Werts des Mediums.

Im Inkubator befand sich auch eine Schale mit Wasser, so dass eine hohe Luftfeuchtigkeit der Inkubatoratmosphäre gewährleistet werden konnte.

Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C, was ebenfalls den Bedingungen *in vivo* entspricht. Um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, sind die Oberflächen im Inkubator mit einer Kupfer-Edelmetalllegierung beschichtet. Kupfer wirkt bakterizid und fungizid.

Die Zellen wurden in transparenten Kulturflaschen inkubiert. Diese haben eine große Oberfläche und gewährleisten somit eine hohe Zellzahl pro Kulturflasche. Die Kulturflaschen wurden mit einem Drehverschluss verschlossen, der eine Filtermembran enthält. Diese sorgt dafür, dass ein Gasaustausch zwischen der Luft im Inkubator und der Kulturflasche stattfinden kann, sind aber undurchlässig z.B. für Schmutz, Bakterien oder Hefen.

Die zur Kultivierung verwendeten, isotonischen Nährmedien, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI) 1640, enthalten die zum Zellwachstum benötigten Nährstoffe (wie Vitamine oder Aminosäuren³). Zudem sind ihnen Glukose und Glutamin zugesetzt. Diese sind besonders wichtig für Tumorzelllinien, deren Energiestoffwechsel stark von Glykolyse mit anschließender anaerober Milchsäuregärung und Glutaminolyse abhängig ist (und nicht vom Zitratzyklus). Bei diesem Phänomen spricht man vom Warburg-Effekt.

Die Medien enthalten außerdem den Farbstoff Phenolrot, der abhängig vom pH-Wert des Mediums seine Farbe ändert. Färbt er sich Gelb, so ist das Medium zu sauer, färbt er sich Pink, so ist das Medium zu basisch. Dieser ist in den Nährmedien für alle Mikroskopieversuche nicht enthalten, da er optische Eigenschaften aufweist, die Artefakte verursachen.

Den Medien wurde abhängig von der Zelllinie ein gewisser Prozentsatz fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt (10% (Volumen pro Volumen (v/v), nach dem Auftauen 20% (v/v)). In diesem sind z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone enthalten. Das Wachstum der Zellen im Medium wird dadurch beschleunigt.

Die Zelllinie Neuro 2A (N2A) benötigt außerdem 1% nicht-essentielle Aminosäuren im Medium.

Das Mediumvolumen in der Kulturflasche wurde immer konstant gewählt, damit ein optimaler Austausch zwischen Sauerstoff und CO₂ stattfinden kann.

³ <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/technical-resources/media-formulation.8.html>

2.2.2 Mediumwechsel

Der Wechsel des Nährmediums der Zellen dient dazu, verbrauchte Nährstoffe, wie z.B. Aminosäuren oder Wachstumsfaktoren, etwa Hormone, im Medium zu ersetzen und den Zellen somit optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Auch verschiedene Faktoren, die von apoptotischen oder nekrotischen Zellen freigesetzt werden und das Wachstum der anderen Zellen hemmen können, werden so entfernt.

Dazu wurde das alte Medium mittels einer Pasteurpipette, die durch einen Schlauch mit einer durch ein Fußpedal zu bedienenden Saugpumpe verbunden ist, entfernt. Tote oder sterbende Zellen, die nur lose mit der Oberfläche verbunden oder nicht mehr adhären sind, wurden durch Zugabe und Entfernen von mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) abgewaschen und entfernt. Vitale Zellen überstehen diese Prozedur. Im Anschluss wurde frisches, auf 37 °C erwärmtes Nährmedium zugegeben (22 ml für eine 175-cm²-Kulturflasche, 12 ml für eine 75-cm²-Kulturflasche, 6 ml für eine 25-cm²-Kulturflasche). Sofern nicht anders erwähnt, fanden alle Arbeiten unter der Sterilbank statt.

Ein Wechsel des Nährmediums wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt.

2.2.3 Passage von Zellen

Wenn Zellen zu dicht wachsen, ändern sich - evtl. auch dauerhaft - ihre Wachstumseigenschaften und -geschwindigkeit. Bevor die Zellen konfluent wachsen, d.h. einen Rasen bilden, wird ein Teil von ihnen in eine neue Kulturflasche überführt (bei etwa 90% Konfluenz). Dieser Vorgang nennt sich Passagieren.

Bei adhären Zellen müssen diese für die Passage von der Plastikoberfläche der Kulturflasche abgelöst werden. Dazu wird eine Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung eingesetzt. Trypsin ist eine Protease, die Proteine unspezifisch schneidet. Die Verankerungen der extrazellulären Matrix (EZM) der Zellen an die Oberfläche der Kulturflasche und untereinander werden so durchtrennt und die Zellen verlieren ihre Adhärenz und vereinzeln. EDTA ist ein Komplexbildner und bindet zweiwertige Kationen, wie z.B. Mg²⁺ oder Ca²⁺. Da diese für die Bindung der EZM-Proteine an die Oberfläche und für ihre Vernetzung benötigt werden, unterstützt EDTA die Trypsinwirkung (Verlust der Adhärenz).

Beim Passagieren wurde zuerst das alte Medium entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gespült und das PBS durch Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt (2 ml für eine 175-cm²-Kulturflasche, 1,5 ml für eine 75-cm²-Kulturflasche, 1 ml für eine 25-cm²-Kulturflasche). In dieser Lösung wurden die Zellen für 3-5 min (bis sie sich leicht ablösen lassen, allerdings nicht länger als 10 min) in den Inkubator gestellt. Nach der Inkubation wurde das vierfache Volumen an serumhaltigem Medium zugegeben, wodurch die vom Trypsin katalysierte Reaktion kompetitiv gehemmt wird, da im FCS viel Protein enthalten ist. Mit einer serologischen Pipette wurden die evtl. noch lose an der Oberfläche der Kulturflasche haftenden Zellen abgespült und die Zellsuspension in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen übertragen. Die Zellsuspension wurde bei 500 rpm und Raumtemperatur (RT) 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt (s.o.) und das Pellet, das aus den Zellen besteht, in 5 ml serumhaltigem Nährmedium resuspendiert. Je nach Konfluenz wurde dann ein bestimmter Anteil dieser Suspension in eine neue Kulturflasche mit frischem, auf 37 °C erwärmtem, serumhaltigem Nährmedium überführt. Diese wurde dann in den Inkubator gestellt.

Eine Passage der Zellen wurde nach Bedarf bei etwa 90%-iger Konfluenz durchgeführt.

2.2.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Wenn für die nachfolgenden Versuche eine festgelegte Zellzahl erforderlich war, mussten die Zellen vor dem Passagieren in eine neue Kulturflasche oder eine Multiwellplatte gezählt werden. Dies ist mit einer Neubauer-Zählkammer möglich. In diese ist ein quadratisches Gitter geätzt, das das Zählen ermöglicht (siehe Abb. 14).

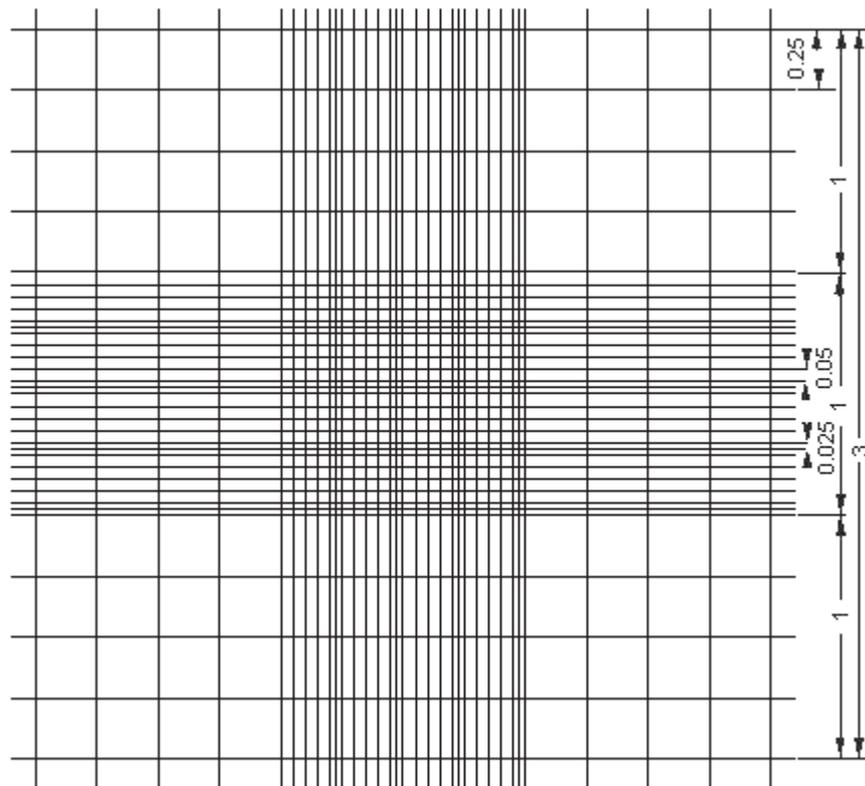


Abb. 14) Zählgitter der Neubauer-Zählkammer⁴. Abgebildet sind die verschiedenen Quadrate auf der Neubauer-Zählkammer. Für die Zellzählung werden die vier 4x4-Großquadrate in den Ecken verwendet.

Vor dem Zählen wurde aus der Zellsuspension nach Zentrifugation ein kleines Aliquot entnommen (15 μ l) und mit dem vierfachen Volumen (60 μ l) Trypanblau-Lösung (0,5% Masse pro Volumen (w/v) in PBS) versetzt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nicht in vitale Zellen gelangen kann. Tote Zellen werden hingegen Tiefblau angefärbt und werden nicht mitgezählt.

Ein Deckglas wurde auf die Neubauer-Zählkammer aufgelegt, diese mit der Lösung gefüllt und die Zellzahl (vitale Zellen) in den vier großen Eckquadraten unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dabei werden jeweils die Zellen mitgezählt, die sich auf einer der linken und der oberen Begrenzungslinien des Gitters befinden, nicht jedoch die auf den rechten und unteren Begrenzungslinien. Das Zählschema für ein Großquadrat ist in Abb. 15 dargestellt [207].

⁴ <http://lo-laboroptik.de/deutsch/info/zaehl.html>

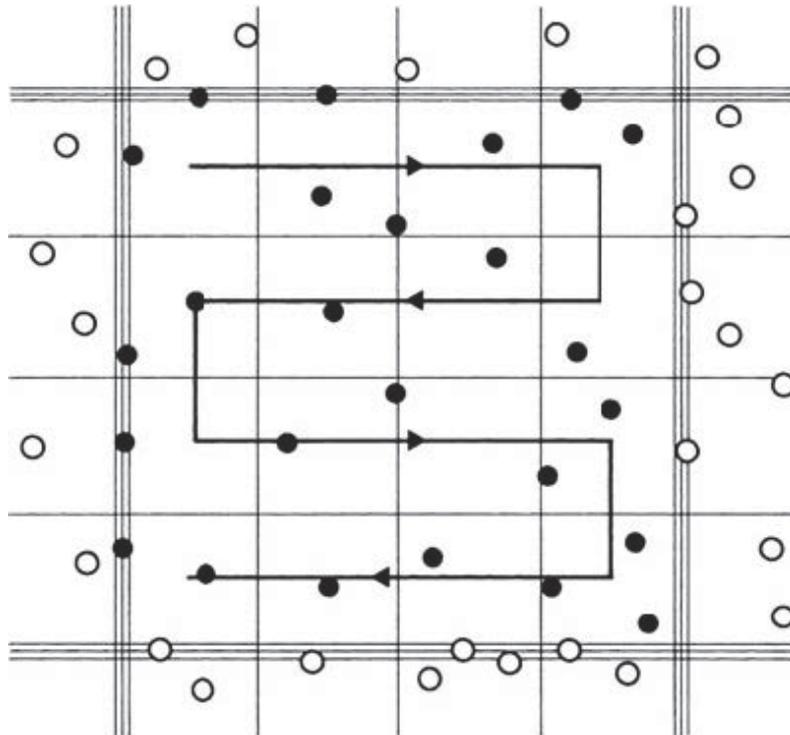


Abb. 15) Zählschema in einem der vier Großquadrate [207]. Die Kreise stellen die Zellen dar. Schwarz-gefüllte Kreise sind Zellen, die mitgezählt werden, weiß-gefüllte Kreise werden beim Zählen nicht berücksichtigt.

Die Zellzahl der Zellen in der Zellsuspension berechnet sich nach:

$$\frac{\text{Zellen gezählt}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Suspensionsvolumen} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Gesamtzahl der Zellen im gesamten Volumen}$$

Der Kammerfaktor für die Neubauerzählkammer beträgt 10^4 , das Suspensionsvolumen 5 ml und der Verdünnungsfaktor in diesem Fall ebenfalls fünf (die Zellsuspension wurde 1:5 mit Trypanblau-Lösung verdünnt).

2.2.5 Phosphatasemodulatortests

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, mit denen die Auswirkung verschiedener Phosphatasemodulatoren auf die Makroautophagie untersucht wurde.

2.2.5.1 Bestimmung der benötigten Bafilomyzin A1-Konzentration

Um die Bafilomyzin A1 (BafA1)-Konzentration zu bestimmen, bei der sich viele Autophagosomen und damit viele lipidierte GABARAP/LC3B-Homologe anreichern, wurden Zellen in einer Multiwell-Platte mit sechs Wells ausgesät (2×10^5 Zellen/Well) und in Medium für zwei Tage inkubiert. Dann wurde in jedes Well BafA1 in jeweils unterschiedlicher Menge (Endkonzentration von BafA1 in den Wells: 0 M; 10 nM; 20 nM; 50 nM; 100 nM; 200 nM)

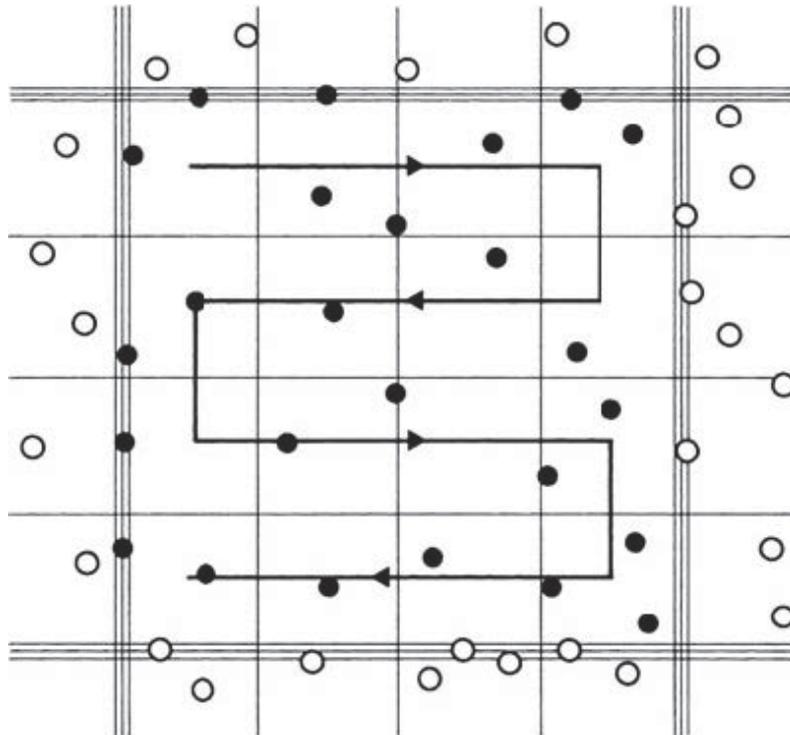


Abb. 15) Zählschema in einem der vier Großquadrate [207]. Die Kreise stellen die Zellen dar. Schwarz-gefüllte Kreise sind Zellen, die mitgezählt werden, weiß-gefüllte Kreise werden beim Zählen nicht berücksichtigt.

Die Zellzahl der Zellen in der Zellsuspension berechnet sich nach:

$$\frac{\text{Zellen gezählt}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Suspensionsvolumen} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Gesamtzahl der Zellen im gesamten Volumen}$$

Der Kammerfaktor für die Neubauerzählkammer beträgt 10^4 , das Suspensionsvolumen 5 ml und der Verdünnungsfaktor in diesem Fall ebenfalls fünf (die Zellsuspension wurde 1:5 mit Trypanblau-Lösung verdünnt).

2.2.5 Phosphatasemodulatortests

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, mit denen die Auswirkung verschiedener Phosphatasemodulatoren auf die Makroautophagie untersucht wurde.

2.2.5.1 Bestimmung der benötigten Bafilomyzin A1-Konzentration

Um die Bafilomyzin A1 (BafA1)-Konzentration zu bestimmen, bei der sich viele Autophagosomen und damit viele lipidierte GABARAP/LC3B-Homologe anreichern, wurden Zellen in einer Multiwell-Platte mit sechs Wells ausgesät (2×10^5 Zellen/Well) und in Medium für zwei Tage inkubiert. Dann wurde in jedes Well BafA1 in jeweils unterschiedlicher Menge (Endkonzentration von BafA1 in den Wells: 0 M; 10 nM; 20 nM; 50 nM; 100 nM; 200 nM)

zugegeben und die Vesikelbildung nach verschiedenen Zeitpunkten (0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 24 h) am Lichtmikroskop überprüft.

2.2.5.2 Phosphatasemodulator-Test - Zeitreihen

Zur Überprüfung des Einflusses verschiedener Phosphatasen auf die Makroautophagie wurden verschiedene Phosphatasemodulatoren (siehe Kapitel 1.4) ausgewählt. Die Auswahl ist in Tabelle 33 dargestellt.

Tab. 33) Wahl der Modulatoren, Wirkung und eingesetzte Volumina

Modulator	IC50-Wert	Wirkung auf Phosphatase	eingesetztes Volumen
bpV(OH)pic	15 nmol/L	PTEN-Inhibitor	8 µl
Calyculin A	0,3 nmol/L	PP2A-Inhibitor	15 µl
Ceramid C6	3 µmol/L	PP2A-Aktivator	1,5 µl
Cypermethrin	0,03 nmol/L	PP2B-Inhibitor	40 µl
Ethyl-3,4-dephostatin	0,58 mg/L	PTP1B-Inhibitor	5 µl
Fostriecin	40 nmol/L	PP2A-Inhibitor	35 µl
Natriumstibogluconat	100 mg/L	PTP1B-/SHP2-Inhibitor	3 µl
Okadainsäure	1 nmol/L	PP2A-Inhibitor	12 µl
PTP-Inhibitor II	43 µmol/L	PTP1B-/SHP1-Inhibitor	5 µl
Tautomycetin	1,6 nmol/L	PP1-Inhibitor	1,5 µl

Die Phosphatasemodulatoren wurden, den Herstellerangaben entsprechend, in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Wasser (H₂O) gelöst. Es wurden Stocklösungen und Aliquots angelegt, die eine für die Versuche geeignete Konzentration aufweisen.

Bei den Versuchen wurde von der Phosphatasemodulator-Lösung so viel eingesetzt, dass die Endkonzentration des Modulators im Medium etwa dem jeweiligen 2,5-Fachen des IC₅₀-Wertes entsprach (das ist die Konzentration, die für die halbmaximale Wirkung benötigt wird). Diese Konzentration sollte hoch genug sein um ihre Wirkung sicherzustellen, auch wenn einige der Modulatoren auf Grund ihrer chemischen Struktur nur begrenzt membranpermeabel sind. Gleichzeitig ist diese Konzentration nicht so hoch, dass die Spezifität der Inhibitoren, die mit unterschiedlichem IC₅₀-Wert auf mehrere Phosphatasen wirken, für die in Tabelle 33 angegebenen Phosphatasen beeinträchtigt ist.

Zwei Tage vor dem Modulatorexperiment wurden 2x10⁵ Zellen in jedes Well einer Multiwell-Platte mit sechs Wells ausgesät.

Am Tag vor dem Modulatorexperiment wurde das Nährmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Das führt dazu, dass sich die Zellen in ihrem Zellzyklus synchronisieren und somit für alle Zellen zu Versuchsbeginn gleichartige Bedingungen herrschen. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurde das serumfreie Medium durch serumhaltiges Nährmedium ersetzt, da das Fehlen von Serum Auswirkungen auf die Aktivierung von autophagischen Prozessen hat. Das soll hier vermieden werden.

Die Zellen wurden mit den Phosphatasemodulatoren in regulärem Nährmedium oder in Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS) entweder mit oder ohne Bafilomycin A1 inkubiert (Abb. 16).

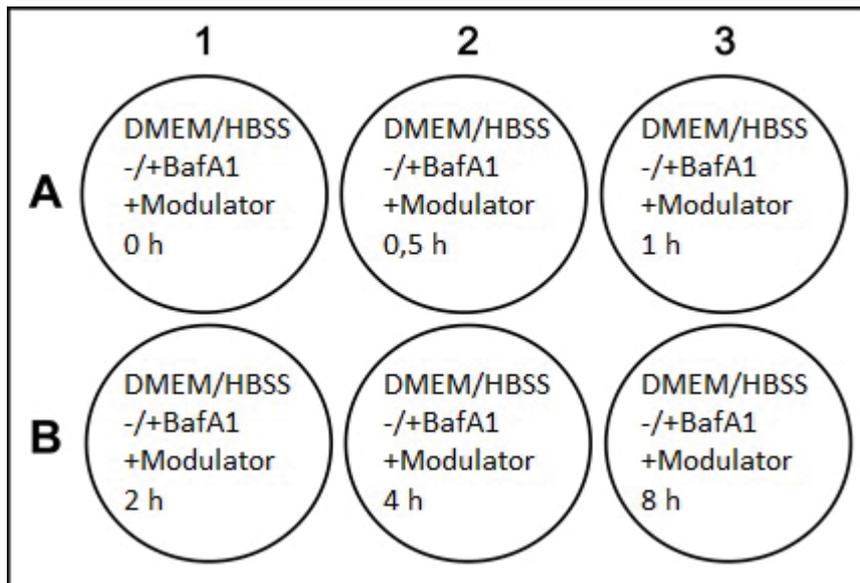


Abb. 16) Versuchsschema für die Zeitreihenexperimente. Für jeden Modulator wurden vier Multiwell-Platten mit je 6 Wells verwendet, zwei mit DMEM und zwei mit HBSS als Medium. Jeweils eine dieser Platten wurde mit Bafilomyzin A1 behandelt, die andere nicht. Die Inkubation wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 8 h) abgebrochen und Zellysate angefertigt (siehe Kapitel 2.2.6). Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blotting mit Antikörpern gegen Atg8-Homologe hinsichtlich der Auswirkungen der Modulatorzugabe auf den autophagischen Flux untersucht.

2.2.5.3 Phosphatasemodulator-Test - Zeitpunkt 4 h

Das Phosphatasemodulator-Experiment wurde für die Modulatoren für den Inkubationszeitpunkt „4 h“ erneut durchgeführt.

Die Prozedur vor und nach den Modulator-Experimenten entsprach der im Kapitel 2.2.5.2 bereits beschriebenen.

Für jeden Modulator wurde dabei eine Multiwell-Platte mit sechs Wells eingesetzt, je zwei Wells mit DMEM und zwei mit HBSS. Davon wurde in je eins Bafilomyzin A1 gegeben in eins nicht. Diese vier Wells wurden jeweils mit dem zu untersuchenden Modulator versetzt. Die anderen beiden Wells wurden mit DMEM inkubiert, eins Bafilomyzin A1, das andere nicht (siehe Abb. 17).

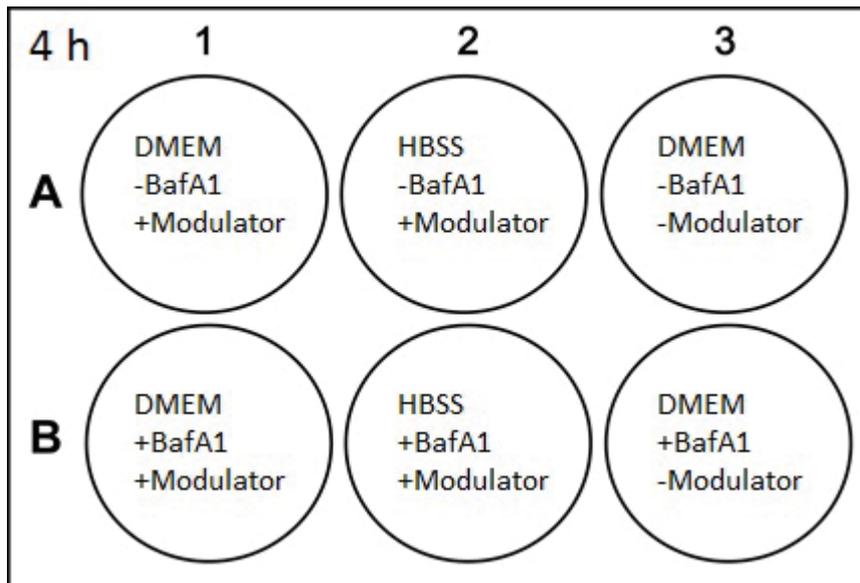


Abb. 17) Versuchsschema für die Modulatorexperimente – Zeitpunkt 4 h. Für jeden Modulator wurde eine nach diesem Schema pipettierte Platte eingesetzt. In den Wells der Reihe B wurde BafA1 zugesetzt, in Reihe A nicht. In den Wells der Spalten 1 und 3 wurde DMEM als Medium verwendet, in denen der Spalte 2 HBSS. In den Spalten 1 und 2 war der Modulator vorhanden.

Die Inkubation wurde nach vier Stunden beendet. Danach wurden die Zelllysate gewonnen.

2.2.6 Anfertigung von Zelllysaten

Nach den eigentlichen Phosphatasemodulator-Experimenten wurden die Zelllysate gewonnen. Dabei wurde ein bereits existierendes Protokoll für die Gewinnung von Zelllysaten nach Experimenten zu Makroautophagiemodulatoren in abgewandelter Form verwendet [208].

Nach dem Abbruch der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 4 °C kaltem, Proteaseinhibitor-haltigem PBS gewaschen und danach für drei bis fünf Minuten bei 37 °C mit 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung pro Well inkubiert um die Zellen abzulösen. Die Trypsinreaktion wurde mit 800 µl Medium pro Well gestoppt und die Zellsuspensionen wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und 1000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl 4 °C kaltem, Proteaseinhibitor-haltigem PBS aufgenommen und bei 4 °C und 1000 g für 5 min zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgenommen und verworfen. So können Mediumreste entfernt werden. Das Zellpellet wurde nun in 100 µl Triton-Lysepuffer aufgenommen und durch zehneckündiges Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde das Zelllysat für 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation auf Eis, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C, 6000 g für 5 min. Nach der Lyse der Zellen, werden auf diese Weise lösliche Proteine (im Überstand) und Zelldebris (im Pellet) getrennt. Für die anschließende Proteinkonzentrations-Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde der Überstand verwendet. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.7 Versuche mit Phosphatase-siRNS

Im Folgenden werden die Versuche beschrieben, die in dieser Arbeit gemacht wurden um die Auswirkung des Einsatzes von kleiner, interferierender Ribonukleinsäure (siRNS) gegen die Phosphatasen PP2A, PTP1B, PTEN und SHP2 auf die Makroautophagie zu untersuchen.

2.2.7.1 RNSi

In den späten 1990er-Jahren wurde beim Transfer von doppelsträngiger RNS in *C. elegans*, das Prinzip der RNS-Interferenz (RNSi) entdeckt [209]. Die Entdecker wurden 2006 wegen der Bedeutung dieser Entdeckung mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Durch diese Methode lässt sich die Translation einer Boten-RNS (mRNS) in Protein spezifisch herunterregulieren.

Wenn doppelsträngige RNS in eine Zelle eingeschleust wird, wird eine Reihe von Reaktionen ausgelöst. Die doppelsträngige RNS kann vom Protein Dicer in etwa 25 Basenpaare lange Stücke geschnitten werden [210]. Diese Stücke werden kleine, interferierende RNS (siRNS) genannt. Bei Anwesenheit von siRNS im Zytoplasma werden die Stränge bei der Bindung an verschiedene Proteine entwunden und aufgetrennt [211]. Durch die Bindung des 3'-5'-Stranges (Leitstrang) an diese Proteine (u.a. eine Nuklease) wird der *RNA-induced silencing complex* (RISC) gebildet [212]. Dieser Komplex kann durch den Leitstrang an die zu diesem komplementäre mRNS geleitet werden, wo es zur Zerstörung der mRNS kommt [213]. Dadurch kann die mRNS nicht mehr translatiert werden. Einen Überblick über die Vorgänge bei der RNSi gibt Abb. 18. Hier muss beachtet werden, dass in dem dargestellten Fall direkt siRNS in die Zelle eingeschleust wird, so dass der Schritt der Zerkleinerung durch Dicer entfällt.

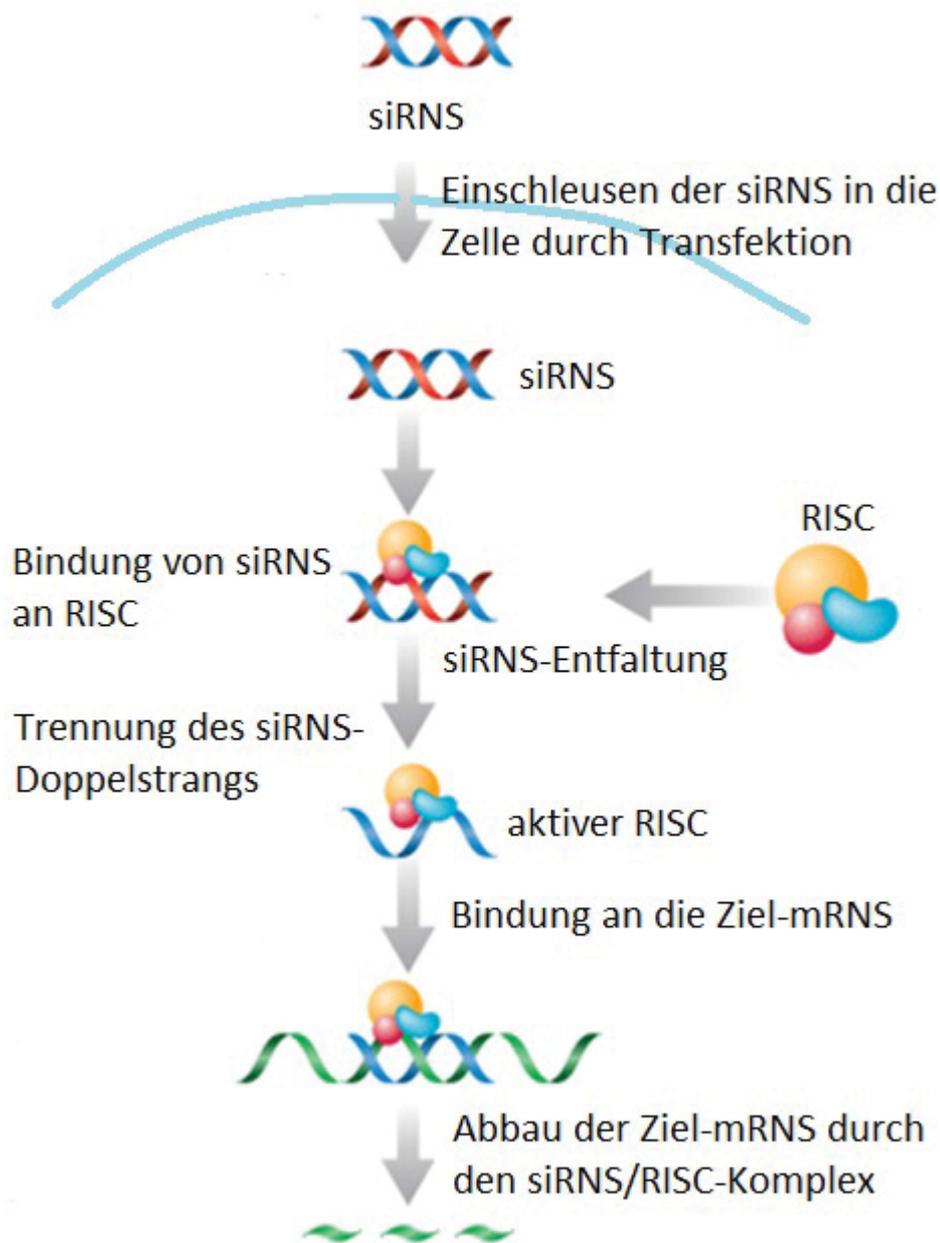


Abb. 18) Der Prozess der RNS-Interferenz (RNSi)⁵. siRNS werden in die Zellen eingeschleust und binden dort an die Proteine des RISC. Durch diese Bindung wird die siRNS entfaltet und die beiden Stränge getrennt. Der nun aktivierte RISC bindet an die Ziel-mRNS, welche von ihm abgebaut wird.

2.2.7.2 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion werden Zellen vorübergehend gentechnisch verändert. Dazu wird eine Desoxyribonukleinsäure (DNS)- oder Ribonukleinsäure (RNS)-Sequenz, die den gewünschten Informationsgehalt trägt, in die Zellen eingeschleust. Es gibt verschiedene Methoden dies zu erreichen, z.B. Elektroporation, Kalziumphosphat-Präzipitation, den

⁵ Modifiziert nach http://www.scbt.com/gene_silencers.html

Transfer mit Nanopartikeln oder mit Liposomen, virale Transfektionsmethoden, Partikelkanonen oder Mikroinjektion.

In dieser Arbeit wurde die transiente Transfektion mit kationischen Nanopartikeln (DharmaFect) durchgeführt. Für die Transfektion mit siRNS eignet sich für die meisten Zelllinien DharmaFect1.

Nach der Transfektion werden die entsprechenden Experimente an den Zellen durchgeführt und die Zellen dann entsorgt.

Die transiente Transfektion wurde den Herstellerangaben des Transfektionsreagens' entsprechend durchgeführt.

Um zu testen, für welche Zelllinie sich der Einsatz von DharmaFect1 eignet, wurden verschiedene Zelllinien (Neuro 2A, HeLa, Hep G2, HEK293) auf jeweils ein Glasbodenschälchen ausgesät (200000 Zellen) und nach 48-stündiger Inkubation mit 10 µl einer fluoreszenzmarkierten (AlexaFluor 488 (AF488)) Negativ-siRNS transfiziert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden Bilder mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) aufgenommen um den Effekt der Transfektion zu überprüfen. Für erfolgreich transfizierte Zellen wird ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal im gesamten Zytoplasma erwartet.

Für die transiente Transfektion mit siRNS wurden Zellen (Neuro 2A, HEK293) in Multiwell-Platten mit sechs Wells ausgesät (200000 Zellen pro Well) und für zwei Tage inkubiert.

In einem 2-ml-Reaktionsgefäß wurde 195 µl serumfreies Medium vorgelegt und 5 µl DharmaFect1 hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dem Medium vermischt. In einem zweiten 2-ml-Reaktionsgefäß wurden die siRNS gegen die Phosphatasen PP2A, PTP1B, PTEN und SHP2 in verschiedenen Volumina (entweder 0 µl, 5 µl, 12,5 µl, 20 µl oder 27,5 µl der siRNS oder 10 µl Negativ-siRNS) so viel serumfreiem Medium hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt, dass ein Endvolumen von 200 µl vorlag. Nach fünfminütiger Inkubation der beiden Ansätze wurde das siRNS enthaltende Medium dem Transfektionsreagens enthaltenden Medium hinzugefügt, durch Auf- und Abpipettieren vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Den Transfektionsansätzen wurde daraufhin 1,6 ml serumhaltiges Medium hinzugefügt und jeder Ansatz in ein Well einer Multiwell-Platte mit sechs Wells mit den zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 24 bis 96 h wurden Zelllysate angefertigt, die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt und eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blotting durchgeführt.

2.2.7.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop ist ein an einen Laser gekoppeltes Lichtmikroskop. Dieser Laser sendet Licht einer festgelegten Wellenlänge aus, das durch eine Anordnung von Spiegeln und Linsen geleitet und auf einen Punkt der zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Probe fokussiert wird. Die emittierte Fluoreszenz durch ein Linsen- und Spiegelsystem zu einem Detektor geleitet, welcher das Signal aufnimmt und an die Software des LSM weitergibt. Die gesamte Probe kann Punkt für Punkt in drei Dimensionen (X, Y, Z) durchgerastert (gescannt) werden. Die Summe der Signale für jeden Punkt der Probe ergibt das fertige Bild.

Dabei liegen die Vorteile dieser Technik in ihrer Vielseitigkeit. LSM kann sowohl *in vitro* z.B. mit Gewebeschnitten oder toten Zellen als auch *in vivo* an lebendem Gewebe oder Zellen genutzt werden. Im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie zeichnet sich LSM durch eine höhere Auflösung aus; Proben müssen außerdem nicht komplett „flach“ sein sondern

können eine gewisse Ausdehnung in der Z-Achse haben. Da durch den Fokus auf einen Punkt nur ein geringer Teil der Fluorophore in der Probe gebleicht werden bevor ein neuer Teil der Probe beleuchtet und die Fluorophore in diesem zur Fluoreszenz angeregt werden, ist das Verfahren im Vergleich zur Weitfeld-Lichtmikroskopie auch schonend sowohl für die Fluoreszenzmarkierung als auch für die Probe. Daher können auch *in vivo*-Aufnahmen in der Zeitdimension gemacht werden ohne dass die Probe beschädigt oder die Fluorophore ausgebleicht werden. Außerdem werden durch eine Lochblende, die nur Signale aus dem fokussierten Bereich in den Detektor gelangen lässt, Hintergrundsignale minimiert, die von umliegenden Fluorophoren ausgehen, was die Qualität des erhaltenen Signals erhöht. Der Strahlengang in der konfokalen LSM ist in Abb. 19 schematisch dargestellt, die die erläuterten Vorteile verdeutlicht.

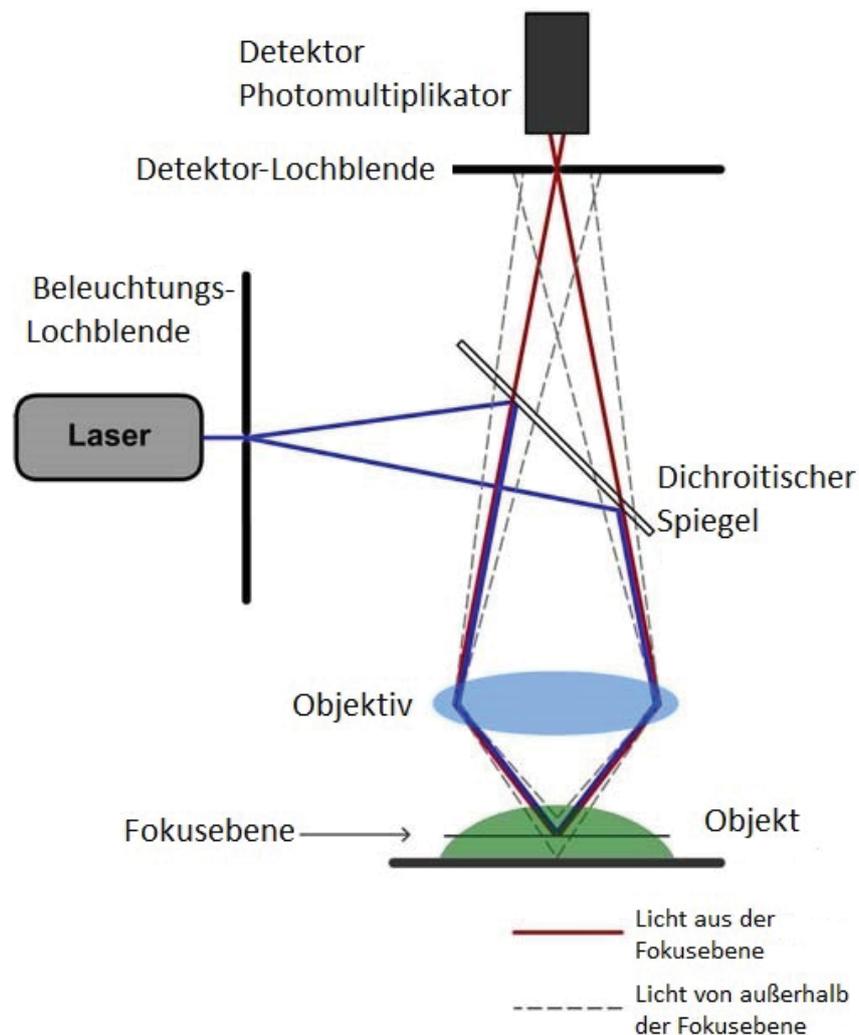


Abb. 19) Strahlengang bei der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) (verändert nach [214]). Das Laserlicht trifft auf einen dichroitischen Spiegel, der Licht mit Wellenlänge oberhalb des Laserlichts durchlässt, das der Laserwellenlänge jedoch in Richtung der Probe reflektiert. Durch eine Objektivlinse wird das Licht auf einen Punkt in der Probe fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzsignal kann den dichroitischen Spiegel durchdringen und gelangt in Richtung Detektor. Vor der Detektion wird das Licht, das nicht vom fokussierten Punkt ausgeht, durch eine Lochblende abgefangen.

Dieser Versuch wurde am LSM 710 von Zeiss durchgeführt. Verwendet wurde das 63x/1,4 (Öl)-Objektiv und ein Argon-Laser. Die Bedienungssoftware ZEN (Zeiss) wurde verwendet. Es wurden Bilder in einer Fokusebene und Staple aus mehreren Fokusebenen aufgenommen.

2.2.8 Proteinkonzentrations-Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Vor der Auftrennung der Lysate durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die Gesamtproteinkonzentration im Zelllysate bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Prinzip des Farbumschlags nach Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) und Kupfersulfat gewählt. Der BCA-Ansatz ist gegenüber z.B. einem Bradford- oder Lowry-Test genauer auch bei höheren Konzentrationen von Detergentien und deshalb gerade bei nicht uniformen Proben (also z.B. bei Zelllysaten) geeignet. Er basiert auf der Biuret-Reaktion von Polypeptiden unter basischen Bedingungen und dadurch erfolgreicher Reduktion eines zweiwertigen Kupferions (Cu^{2+}) zu einwertigem Cu^+ . Dieses formt mit BCA einen Komplex, der Licht von 562 nm Wellenlänge absorbiert. Die Intensität dieses Farbumschlags hängt von der Menge der gebildeten einwertigen Cu^+ -Ionen ab, und damit von der Proteinkonzentration. Die Intensität des Farbumschlags kann photometrisch bestimmt werden.

Da die Reaktion temperaturabhängig ist und nur über einen bestimmten Bereich linear verläuft, wurde bei jeder Messung zusätzlich eine Standardreihe aufgenommen.

Die bei der Messung verwendeten Chemikalien waren Bestandteil des Mikro-BCA-Proteinbestimmungskits von ThermoFisher Scientific. Die Messung der Absorption fand am Polarstar Optima Spektrometer statt.

Für die Messung wurden von den Zelllysaten 22 μl abgenommen und mit 198 μl 2% SDS verdünnt (1:10). Für die Standardreihe wurden Aliquots von Rinderserumalbumin (BSA) in 2% SDS vorbereitet (in Konzentrationen von 0 bis 0,5 mg/ml).

In eine Mikrottestplatte mit 96 Wells wurden in jedes Well 100 μl nach Herstelleranweisung gemischtes BCA-Reagens (25:24:1 - Reagens A:Reagens B:Reagens C) vorgelegt. Dazu wurden jeweils im Vierfach-Ansatz die Proben für die Standardreihe und jeweils im Doppelansatz die Proben der Zelllysate pipettiert (Pipettierschema in Abb. 20).

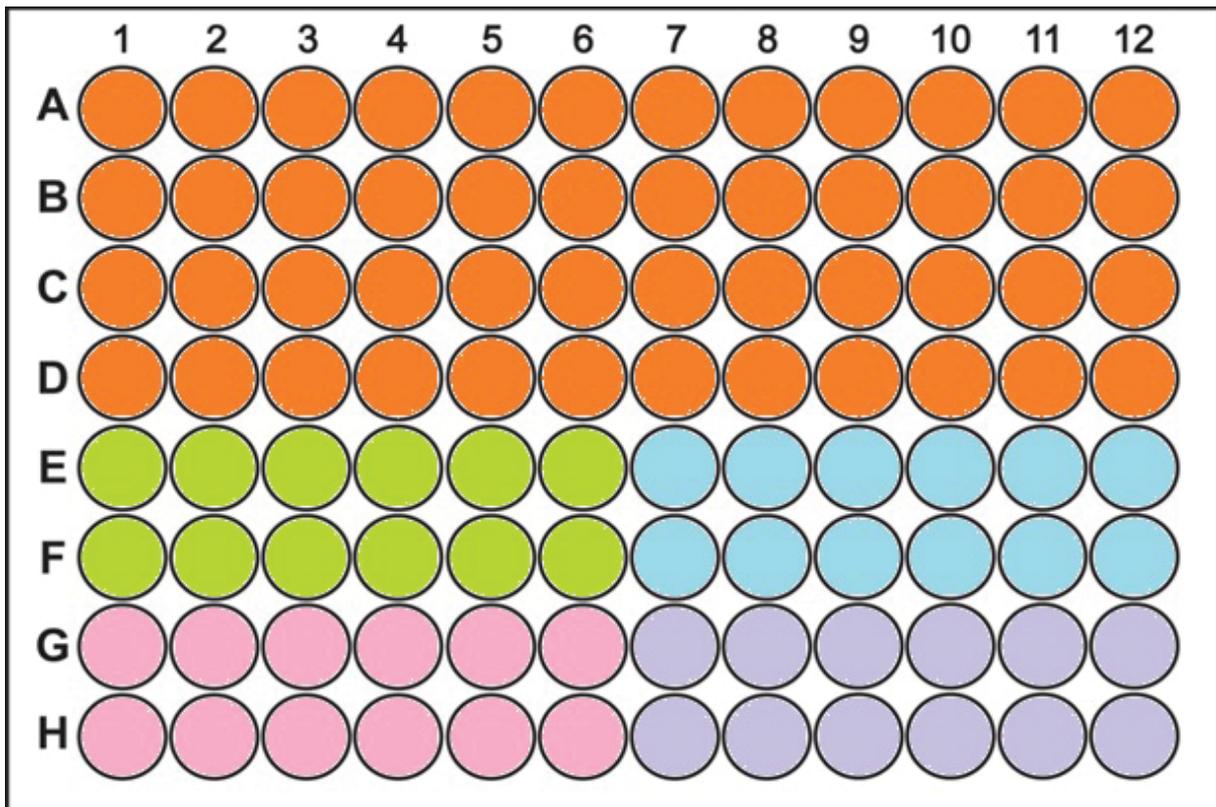


Abb. 20) Pipettierschema einer Mikrotestplatte bei der Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA). In Orange die Wells für eine Standardreihe in vierfacher Ausführung, in Grün, Blau, Rosa und Lila die Wells für Zelllysate in Doppelansatz. Eine der Farben steht dabei für eine Versuchsreihe auf einer Multiwell-Platte mit sechs Wells. Pro Mikrotestplatte können also die Proteinkonzentrationen von vier Versuchsansätzen bestimmt werden.

Die Mikrotestplatte wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Vor der Bestimmung der Absorption am Polarstar Optima Spektrometer wurde die Platte für 1-2 min auf einem Schüttler bei etwa 250 rpm belassen um Luftblasen zu entfernen, die die Absorptionsbestimmung stören würden.

An Hand der Standardreihe konnte eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Funktionsgleichung die Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten bestimmt werden konnten.

2.2.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE nach Laemmli [215] dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Bei angelegter Spannung driften die Proteine durch eine Polyacrylamidmatrix. Dabei hängt ihre Driftgeschwindigkeit von ihrer Größe (und damit unter denaturierenden Bedingungen von ihrem Molekulargewicht) ab. Das liegt daran, dass das im Proben- und Laufpuffer enthaltene SDS an Proteine bindet. SDS ist ein anionisches Detergens, verleiht den Proteinen also eine negative Gesamtladung. Die negativen Eigenladungen eines Proteins werden hierbei durch die Bindung von vielen SDS-Molekülen so stark überlagert, dass sie vernachlässigbar sind. Der Einfluss positiver Eigenladungen, die ein Protein unter

physiologischen Bedingungen hat, wird durch einen pH-Wert des Laufpuffers im basischen Bereich minimiert.

Das Verhältnis von Ladung zu Gewicht und damit die Beschleunigung, die ein Protein in einem elektrischen Feld erfährt, bleiben dabei unabhängig von der Proteingröße gleich. Da Proteine mit höherem Molekulargewicht, durch die Porengröße der Matrix bedingt, in ihrer Wanderung stärker behindert werden, sind sie langsamer als solche mit niedrigerem Molekulargewicht.

Die Denaturierung der Proteine wird durch Zugabe von SDS, β -Mercaptoethanol und Erhitzen der Probe (95 °C) erreicht. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken getrennt, die Zugabe von SDS und das Kochen der Probe bewirken die Auflösung von Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen.

Die Auflösung der Auftrennung kann durch die Zusammensetzung des Gels beeinflusst werden. Ein engmaschiges Gel (z.B. 20% Polyacrylamid) ist für die Auftrennung kleinerer Proteine geeignet, während ein weitmaschiges Gel (z.B. 5% Polyacrylamid), für die Auftrennung von Proteinen höheren Molekulargewichts geeignet ist.

Das Gel besteht aus zwei Phasen, Sammelgel und Trenngel, die sich in ihrem pH-Wert und ihrem Polyacrylamidgehalt unterscheiden. Beim niedrigen pH-Wert im Sammelgel driften die Proteine in der Probe hinter einer Front aus Chlorid-Anionen und vor bei diesem pH-Wert nur teilweise negativ geladenen Glycinmolekülen. So werden sie in einem engen Bereich konzentriert. An der Grenze von Sammel- und Trenngel ändert sich der pH-Wert und die Glycinmoleküle sind nun vollständig negativ geladen. Dadurch erhöht sich ihre Mobilität über die der Proteine. Diese sind nun langsamer als die Glycinmoleküle und werden im Trenngel nun nicht mehr konzentriert, sondern, wie oben beschrieben, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden sowohl selbst gegossene als auch kommerziell erhältliche Gele verwendet, in beiden Fällen beruhend auf Tris-Puffer.

Der Laufpuffer war ein Puffer auf Tris/Glycin-Basis, dem 0,5% SDS zugesetzt wurde.

18 μ l der Probe, deren Gesamtproteinkonzentration zuvor bestimmt wurde, wurden mit 6 μ l Laemmli-Puffer verdünnt (4:1) und für 5 min bei 95 °C erhitzt. In die Taschen des Gels wurde von jeder Probe so viel zugegeben, dass der Proteingehalt in jeder Tasche gleich war. Außerdem wurden zwei Taschen mit je 5 μ l *PreStained Protein Ladder* (Marker) und je eine Tasche mit 0,5 μ l einer LC3B-Lösung und mit 10 μ l einer GABARAP-Lösung (Positivkontrollen) beschickt. Die Einstellungen der Stromquelle bei der SDS-PAGE betragen 40 mA, 500 V, 100 W für 45 min.

2.2.10 Proteintransfer und -detektion nach dem Western-Blot-Prinzip

Da das Bandenmuster eines Zelllysats auf einem Gel als Ergebnis einer SDS-PAGE keine stichhaltige Aussage über die zu untersuchenden Proteine (z.B. GABARAPs/LC3B; Phosphatasen) zulässt, da die Proteine durch Coomassie unspezifisch angefärbt werden, sich die Signale unterschiedlicher Proteine überlagern können und über das Verfahren geringe Proteinkonzentrationen nicht nachgewiesen werden können, wurde nach der SDS-PAGE ein Western-Blotting nach dem Semi-Dry-Verfahren durchgeführt.

Dabei werden die Proteine des Gels unter Anlegen einer Spannung auf eine Membran (hier: Polyvinylidendifluorid (PVDF)) übertragen. Diese Membran wird danach mit Antikörpern (AK) behandelt, um das zu untersuchende Protein spezifisch nachweisen zu können.

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 21 dargestellt. Im Unterschied zur Abbildung wurde bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen eine zusätzliche Schicht Filterpapier auf der Seite der Anode hinzugefügt.

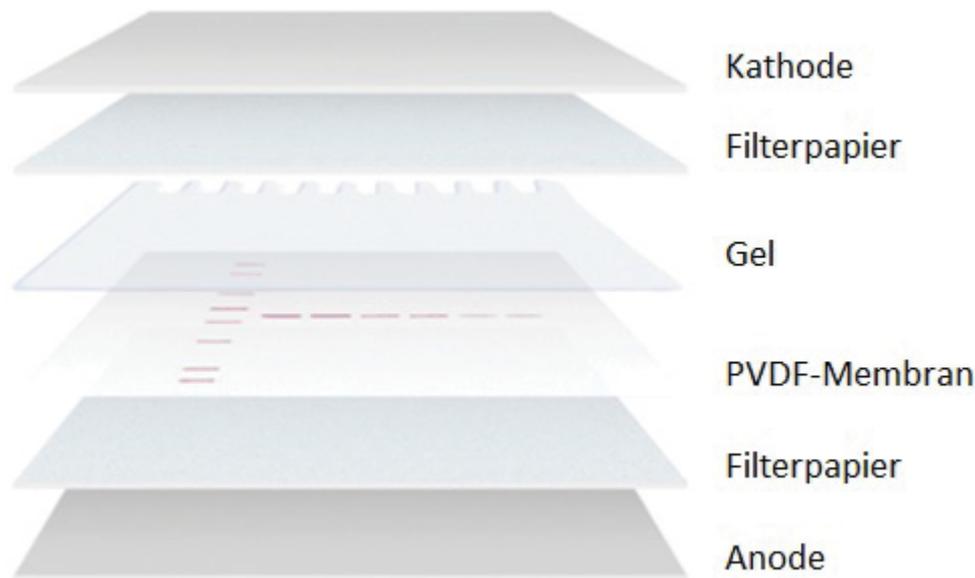


Abb. 21) Blotting-Sandwich⁶. Dargestellt ist der Aufbau der Blotting-Kammer nach dem Semi-Dry-Verfahren.

Beim Western-Blotting wurden in die Blotting-Kammer zuerst drei in Anodenpuffer 1 (An1) getränkte Whatman-Papiere gelegt, darauf drei in Anodenpuffer 2 (An2) getränkte Whatman-Papiere. Es folgte die auf Größe des Gels zugeschnittene PVDF-Membran, darauf das Gel und darauf drei in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere. Vor dem Schließen der Kammer wurden Luftblasen im Stapel, die bei der Übertragung der Proteine auf die Membran stören, durch Rollen eines 50-ml-Zentrifugenröhrchens - unter leichtem Druck - über den Stapel entfernt.

Beim Transfer der Proteine, waren die Einstellungen des Netzteils 0,3 A; 25 V; 10 W für 60 min.

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran entnommen und in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Die PVDF-Membran wurde für 5 min mit Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,1% (v/v) Tween20 (TBST) bei RT gewaschen und dann mit 10% (w/v) Milchpulver in TBST für 45 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit dem entsprechenden Erstantikörper in einer nach Herstellerangaben geeigneten Verdünnung von TBST (Maus anti LC3B 1:200, alle anderen 1:1000) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die PVDF-Membran dreimal mit TBST für je 5 min bei RT gewaschen und im Anschluss für 2 h bei RT mit dem nach Herstellerangaben in TBST verdünnten Zweitantikörper (1:10000, Ziege anti Maus/Kaninchen), an den Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBST (5 min, RT). Die Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Rollenmischer.

Danach wurde die Membran für 3 min in einer 1:1-Mischung der beiden Komponenten des „Super signal dura“-Kits (Luminollösung und Peroxidlösung) entwickelt. Mit dem

⁶ Verändert nach: <http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/protein-blotting-methods>

ChemiDoc MP-System wurde die Membran entwickelt und fotografiert und mit der zugehörigen Software ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Signal nicht den Aufnahmebereich des Geräts übersteigt („Sättigung“).

2.2.11 Detektion mit mehreren Antikörpern

Um auf der gleichen Membran mehrere Proteine nacheinander spezifisch detektieren zu können, kann die Membran zwischen den einzelnen Detektionsschritten von den gebundenen Antikörpern befreit werden (ab hier als „Strippen“ bezeichnet). Dabei wird die Bindung der Antikörper an die jeweiligen Zielproteine auf der Membran durch verschiedene Pufferbedingungen rückgängig gemacht. Danach kann die Membran, wie im Kapitel 2.2.10 beschrieben, mit einem weiteren Antikörper behandelt werden. Dieser Prozess kann etwa 3-5 Mal wiederholt werden, ohne dass ein großer Qualitätsverlust stattfindet (z.B. durch Ablösung der Proteine von der Membran oder Veränderungen der Membran).

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurden die Membranen nach der Detektion an der ChemiDoc MP einmal für 5 min mit TBST gewaschen. Darauf folgte zweimalige Inkubation der Membran für jeweils 15 min mit kochendem Wasser. Dabei sollen die Antikörper durch die hohe Temperatur denaturiert werden. Zwei Inkubationsschritten mit Stripping-Puffer (siehe Tab. 23) für jeweils 10 min bei RT (Denaturierung durch pH-Wert im sauren Bereich, SDS, Tween20), folgten zwei Waschschrte für jeweils 10 min mit PBS. Im Anschluss daran wurde noch einmal für 5 min bei RT mit TBST gewaschen, bevor die Membran erneut geblockt und mit einem Erstantikörper behandelt wurde. Die Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Rollenmischer.

2.2.12 Auswertung der Western-Blots

Um die Banden nach Entwicklung des Western-Blots zu quantifizieren, wurden die Proteinspuren und die Banden manuell markiert. Von der Software der ChemiDoc MP wurde daraufhin die Gesamtzahl und Intensität der schwarzen Pixel einer Bande berechnet. Innerhalb des Messbereichs des Geräts (d.h. unterhalb der Sättigung), bedeutet mehr Signal dunklere Pixel und damit mehr Protein. So lassen sich innerhalb eines Blots Banden untereinander vergleichen. Um von der Intensität der Banden auf den Makroautophagieflux schließen zu können, wurde jeweils die Differenz der Banden der lipidierten Form mit und ohne Zugabe von Bafilomycin A1 gebildet [216]. Durch den Vergleich dieser Differenz unter verschiedenen Bedingungen wurden die Effekte der Bedingungen auf den Makroautophagieflux bestimmt. So kann abgeschätzt werden, ob diese Bedingungen die Makroautophagie stimulieren oder inhibieren. Mit der Software SigmaPlot wurden dann entsprechende Grafiken erstellt.

2.2.13 Mykoplasmentest

Beim Mykoplasmentest werden die Zelllinien daraufhin untersucht, ob sie mit Mykoplasmen kontaminiert sind. Diese sind, anders als Bakterien oder Pilze, auf Grund ihrer geringen Größe nicht unter dem Lichtmikroskop sichtbar und können sich intrazellulär vermehren. Mykoplasmen können den Zellstoffwechsel verändern und eine Kontamination mit Mykoplasmen kann daher einen negativen Einfluss auf die Aussagekraft von in der Zellkultur gewonnenen Ergebnissen ausüben.

2.2.13.1 Probenvorbereitung für den Mykoplasmentest

In dieser Arbeit wurden die Zellkulturen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Mykoplasma-Test-Kits (von AppliChem) auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Von zwei nahezu konfluenten Neuro 2A-Zellkulturen wurde je 1 ml Kulturüberstand abgenommen und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 250 g für 5 min bei RT wurde der Überstand in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 20000 g für 10 min bei RT wurden evtl. vorhandene Mykoplasmen sedimentiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 50 µl der im Kit vorliegenden Pufferlösung resuspendiert und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Im nächsten Schritt wurde die Mykoplasmen-DNS mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert um sie ggf. auf einem Agarosegel detektieren zu können.

Dabei wurden die Probenansätze wie folgt pipettiert:

Tab. 34) Pipettierschema für den Mykoplasmentest

Positivkontrolle	Negativkontrolle	Probe Überstand
1 µl Positivvorlage		5 µl Probe
10 µl Reaktionsmix	10 µl Reaktionsmix	10 µl Reaktionsmix
39 µl H ₂ O	40 µl H ₂ O	35 µl H ₂ O

Im Kit enthalten waren die Mykoplasmen-DNS als Positivkontrolle und der Reaktionsmix, der die dNTPs, die *Thermus aquaticus* (*Taq*)-Polymerase und für diese wichtige Salze (MgCl₂) enthält.

Die DNS in den verschiedenen Ansätzen wurde durch PCR (s.u.) vervielfältigt.

Nach der Amplifikation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) durchgeführt.

2.2.13.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion kann DNS amplifiziert werden. Genutzt wird hierbei dass sich DNS-Stränge bei bestimmten Temperaturen trennen und aneinander anlagern. Unter Anwesenheit einer thermostabilen DNS-Polymerase, entsprechenden Primern, Nukleotiden und für die DNS-Polymerase benötigten Salzen, wird eine DNS-Probe einer Reihe gleichartiger Thermozyklen unterworfen und kann so vermehrt werden.

Zu Beginn liegt ein doppelsträngiges DNS-Molekül vor. Durch Erhitzen (auf z.B. 94 °C) werden die beiden Stränge voneinander getrennt (Denaturierung). Bei niedrigerer Temperatur (abhängig vom Guanin/Cytosin-Gehalt der Primer, z.B. 60 °C) können sich entsprechende

Primer komplementär an die Stränge anlagern („*Annealing*“). Diese werden von der Polymerase (hier: *Taq*-Polymerase) erkannt und nach Erhitzen auf das Temperaturoptimum der Polymerase (auf 72 °C) durch diese verlängert (Elongation). So werden die beiden DNS-Stränge komplementär ergänzt. Nach erneutem Erhitzen (auf 94 °C) trennen sich die Stränge wieder, man kühlt ab, usw. Dieser Zyklus kann in einem PCR-Cycler automatisiert mehrfach wiederholt werden. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der DNS-Stränge. Ein Schema des beschriebenen Vorgangs findet sich in Abb. 22.

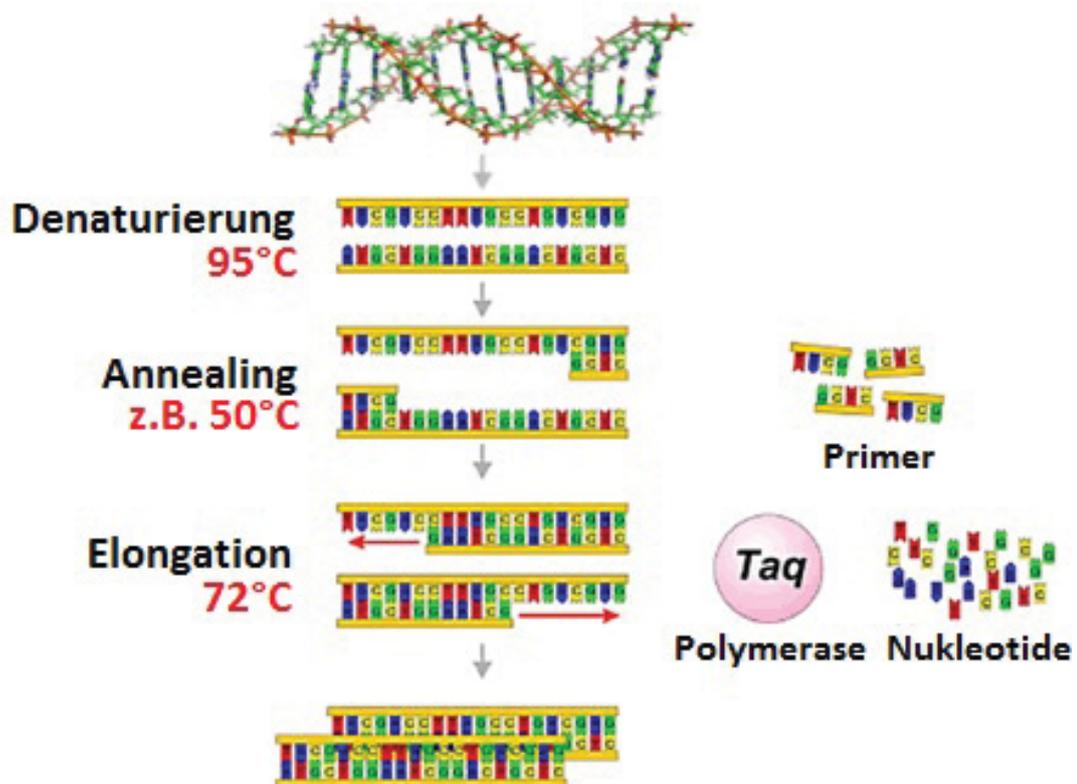


Abb. 22) Zyklus bei der Polymerasekettenreaktion (PCR)⁷. In Blau, Rot, Grün und Gelb die verschiedenen Nukleotide (mit ihrem jeweiligen Kürzel). Bei der Denaturierung trennen sich die beiden DNS-Stränge, beim „*Annealing*“ lagern sich die Primer an, bei der Elongation verlängert die *Taq*-Polymerase (rosa) die Primer und ergänzt die Stränge komplementär. Am Ende des Zyklus stehen zwei zum Ausgangsstrang identische DNS-Stränge. Dieser Zyklus wird bei der PCR mehrfach wiederholt.

Für die PCR wurden die wie beschrieben (Kapitel 2.2.13.1) vorbereiteten Proben eingesetzt. Bei der PCR wurden die Temperatureinstellungen nach Herstellerangaben des Mykoplasmen-Test-Kits gewählt:

⁷ <http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/die-polymerasekettenreaktion-pcr->

Tab. 35) Einstellungen für die PCR

Temperatur	Zeit	
94 °C	30 sec	} 35 Zyklen
94 °C	30 sec	
60 °C	120 sec	
72 °C	60 sec	
94 °C	30 sec	
60 °C	120 sec	
72 °C	300 sec	

An die PCR schloss sich eine Agarose-Gelelektrophorese an.

2.2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe wird die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Man macht sich dabei die negative Ladung von DNS zu Nutze, die bewirkt, dass DNS-Moleküle in einem elektrischen Feld driften.

Hierzu wird eine Agaroselösung hergestellt, deren Konzentration die Porengröße des späteren Gels bestimmt (je höher die Agarosekonzentration desto kleiner die Poren). Die Porengröße bestimmt den optimalen Trennungsbereich für die Nukleinsäuren. Eine hohe Porengröße ermöglicht die Auftrennung von großen Nukleinsäuremolekülen, während eine geringere Porengröße sich für die Auftrennung kleinerer Nukleinsäuremoleküle eignet.

Dem Gel wird außerdem Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der in doppelsträngige DNS interkaliert (siehe Abb. 23) und diese dadurch unter UV-Licht sichtbar macht.

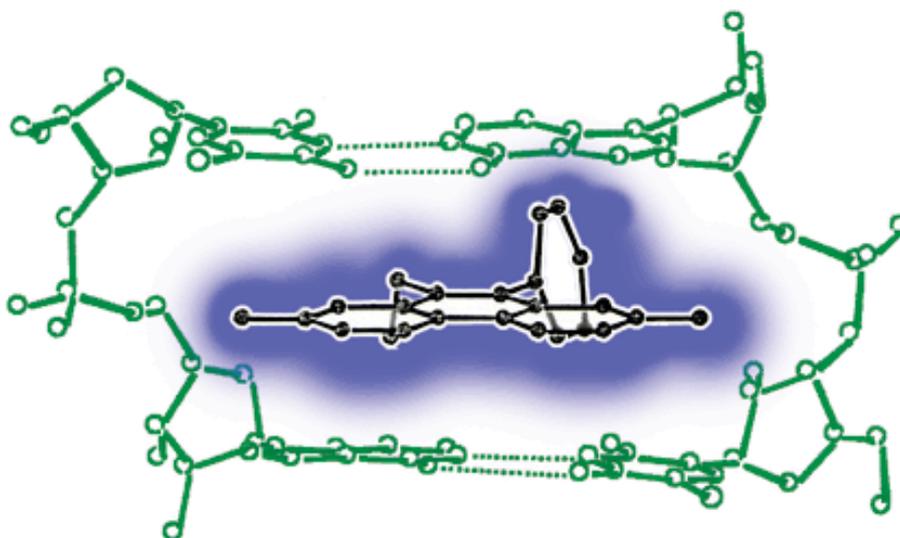


Abb. 23) Ethidiumbromid, in doppelsträngige DNS interkaliert [217]. Der DNS-Doppelstrang ist in Grün dargestellt, das Ethidiumbromidmolekül in Schwarz. Die Ausdehnung des Ethidiumbromidmoleküls ist als blauer Schatten dargestellt.

In dieser Arbeit wurden 2%-ige (w/v) Agarosegele verwendet, um Mykoplasmen-DNS zu detektieren, die bei einer Verunreinigung einer Zellkultur durch Mykoplasmen aus dem Zellkulturüberstand durch PCR vervielfältigt werden kann.

1 g Agarose wurde in 50 ml Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TEE-Puffer) gelöst und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die flüssige Agaroselösung wurde in einer Agarosegel-Gießkammer mit 2,5 µl Ethidiumbromid versetzt, welches verteilt wurde, ein Kamm wurde eingesetzt und gewartet, bis das Gel ausgehärtet war. Dieses wurde dann in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit TEE-Puffer überschichtet und mit den entsprechenden DNS-Proben beladen.

Um die Lauffront im Gel sehen zu können, wurden 20 µl einer Probe mit 4 µl 6x DNS-Ladepuffer versetzt.

Die Einstellungen der Stromquelle für einen Agarose-Gelelektrophorese-Lauf waren 120 V, 250 mA für 30 min.

Nach dem Ende des Laufs wurde unter UV-Licht ein Bild des Gels an der ChemiDoc MP aufgenommen.

3 Ergebnisse

In diesem Teil werden die Ergebnisse der Arbeit dargestellt, beschrieben und ausgewertet. Zuerst wird eine Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen. Im Anschluss folgt die Auswertung der Ergebnisse der Zeitreihenexperimente mit den Phosphatasemodulatoren sowie die Darstellung und Beschreibung der Western-Blots für die Proteine LC3B und GABARAP. Es schließt sich eine Auswertung dieser Western-Blots an. Am Ende dieses Kapitels stehen die Ergebnisse der Experimente mit RNSi.

Da es in diesem Kapitel in Bezug auf autophagische Prozesse nur noch um Makroautophagie geht, wird der Begriff Autophagie hier synonym für Makroautophagie verwendet.

3.1 Mykoplasmentest

Um ausschließen zu können, dass die in den Versuchen verwendete Neuro 2A-Zelllinie mit Mykoplasmen kontaminiert ist, wurde ein Mykoplasmentest im Doppelansatz durchgeführt. In Abb. 24 ist das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese dargestellt.

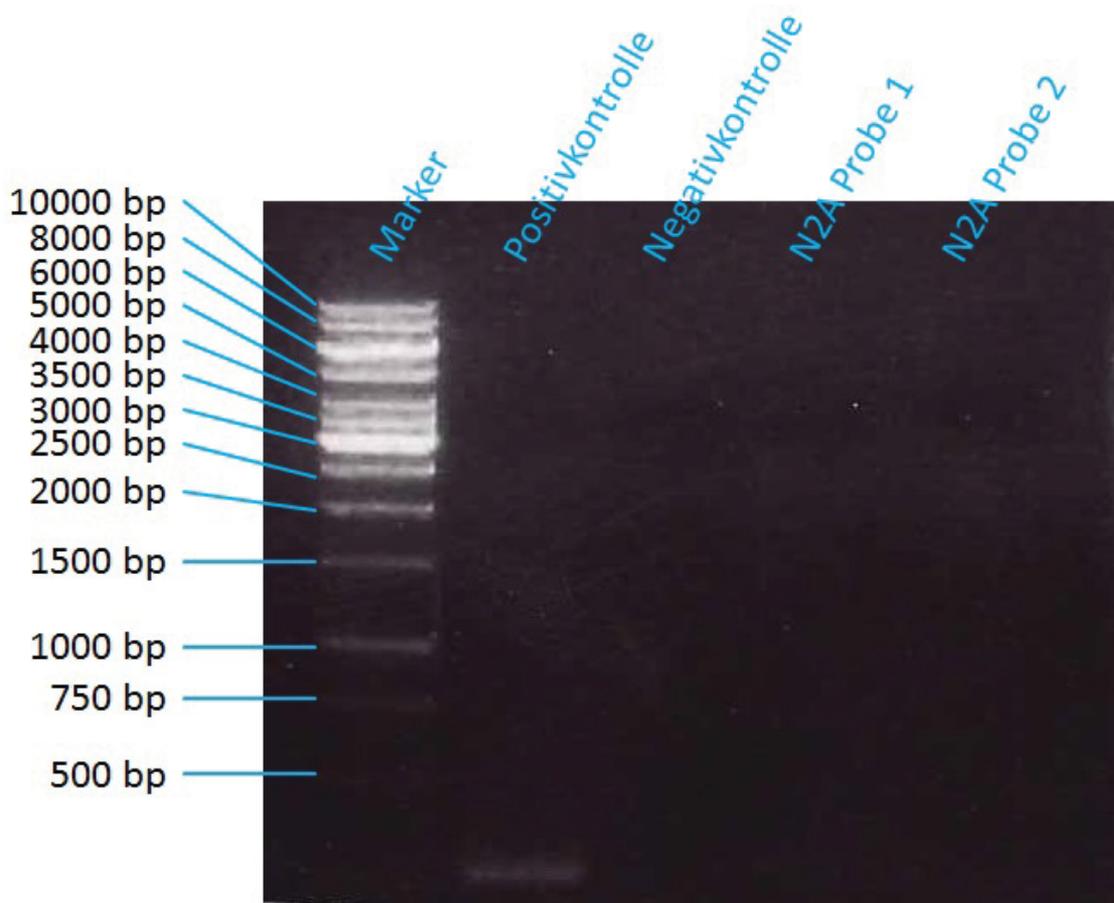


Abb. 24) Ergebnis des Mykoplasmentests. In der ersten Spur wurde der Marker aufgetragen (Maßeinheit ist die Länge eines DNS-Stücks in Basenpaaren (bp)). Bei der Spur der Positivkontrolle zeigt sich bei etwa 250 bp eine Bande, die laut Herstellerangaben des PCR Mykoplasma Testkits auch dort erwartet werden kann. In der Spur der Negativkontrolle zeigt sich keine Bande, ebenso wie in den Spuren, in denen jeweils amplifizierte DNS aus dem Überstand zweier Neuro 2A (N2A)-Kulturen aufgetragen wurde (N2A Probe 1 und 2).

Abb. 24 zeigt deutlich, dass im Gegensatz zur Spur der Positivkontrolle, bei der eine Bande bei etwa 250 Basenpaaren (bp) sichtbar ist, in keiner der anderen Spuren, auf denen Probe aufgetragen ist, eine Bande auftaucht.

Positivkontrolle (eine Bande wird erwartet und eine Bande ist sichtbar) und Negativkontrolle (keine Bande wird erwartet und keine Bande ist sichtbar) haben die erwarteten Ergebnisse geliefert. Das Fehlen von Banden in den Spuren für die Proben aus dem Überstand der Neuro 2A (N2A)-Zellkulturen (N2A Probe 1 und 2) bedeutet, dass die Zellkulturen nicht mit Mykoplasmen kontaminiert sind.

Ergebnisse, die mit diesen Zellen gewonnen werden, wurden also nicht durch eine Infektion der Zellen mit Mykoplasmen verfälscht.

3.2 Zeitreihenexperimente mit den Phosphatasemodulatoren

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente mit den verschiedenen Phosphatasemodulatoren grafisch dargestellt und beschrieben. Zur Auswertung wurde die Intensität der Bande für die lipidierte Form von LC3B in Abwesenheit von BafA1 zu einem bestimmten Zeitpunkt (0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h) von der Intensität der Bande für die lipidierte Form von LC3B in Anwesenheit von 50 nM BafA1 zum gleichen Zeitpunkt subtrahiert. Diese Differenz ist ein Maß für den Autophagiefluss. Der Autophagiefluss wurde gegen die Zeit aufgetragen. So kann eine Zeitspanne bestimmt werden, in der der Effekt der Modulatoren möglichst groß ist. Im nächsten Schritt werden dann zusätzliche Experimente mit den Modulatoren nach dieser Zeitspanne durchgeführt.

Die Spuren der Gele wurden jeweils mit einer Gesamtproteinmenge zwischen 30 µg und 80 µg pro Spur (berechnet nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA) beladen. Dabei wurde für jedes Gel immer die gleiche Menge Protein pro Spur eingesetzt.

3.2.1 Zeitreihe mit bpV(OH)pic

Um den Vorgang der Auswertung zu verdeutlichen, wird dieser hier am Beispiel von bpV(OH)pic näher dargestellt (siehe Abb. 25). In allen Versuchen enthielt das Zellkulturmedium bpV(OH)pic. In den Spuren 1-21 sind die Proben der Zeitreihen aufgetragen, in Spur 22 die Positivkontrolle. In jeder der Spuren 1-21 zeigen sich zwei Banden, von denen die untere der lipidierten Form von LC3B entspricht. Von der Intensität der unteren Bande in Anwesenheit von BafA1 zu einer bestimmten Inkubationsdauer mit dem Modulator wurde die Intensität der unteren Bande in Abwesenheit von BafA1 subtrahiert. Am Beispiel von Abb. 25 wurde so von der Intensität der unteren Bande in Spur 7 die Intensität der unteren Bande von Spur 2 abgezogen; entsprechend wurde für die Spuren 8 und 3, 9 und 4, 10 und 5, 11 und 6 sowie für 12, 18 und 13, 19 und 14, 20 und 15 sowie 21 und 16 verfahren. Diese Differenzen spiegeln den Autophagiefluss unter Hungerbedingungen und unter „Normal“-Bedingungen in Anwesenheit von bpV(OH)pic wider.

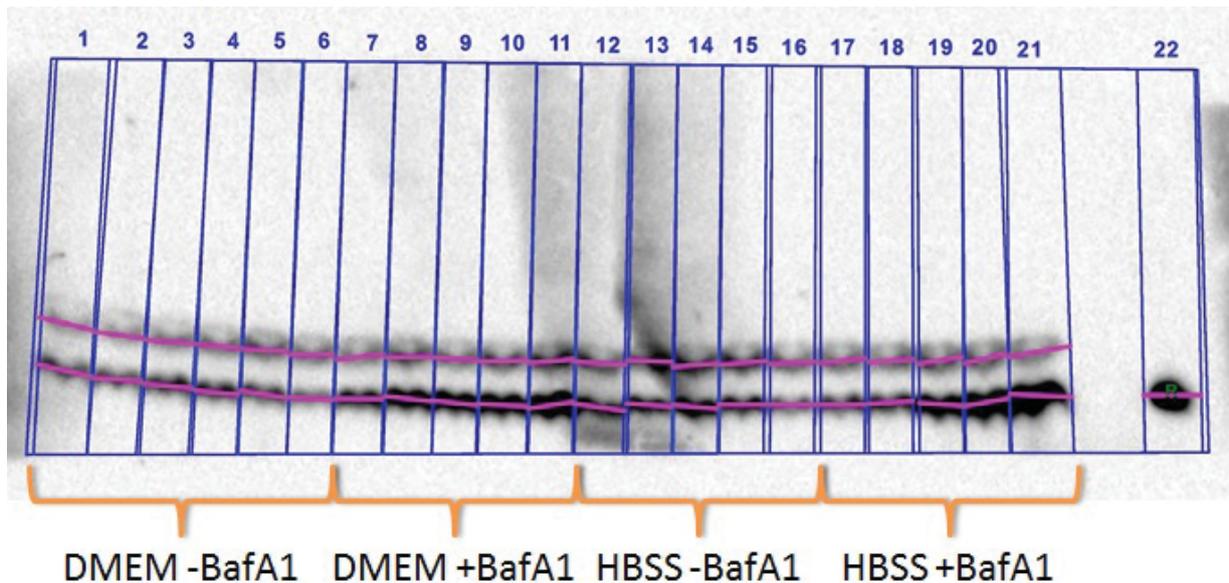


Abb. 25) Auswertung des Zeitreihenexperiments für bpV(OH)pic. Detektiert wurde mit einem 1:200 in TBST verdünnten Maus-anti-LC3B-Erst-AK und einem 1:10000 in TBST verdünnten Ziege-anti-Maus-Sekundär-AK (an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt). In den Spuren 1-21 sind die Proben aufgetragen, in Spur 22 die Positivkontrolle. In den Spuren 1-11 wurden die Proben der Zelllysate von in regulärem Zellmedium (DMEM) kultivierten Zellen ohne (Spur 1-6) und mit BafA1 (Spur 7-11) aufgetragen. In den Spuren 12-21 wurden die Zelllysate der unter Hungerbedingungen (HBSS) kultivierten Zellen ohne (Spur 12-16) und mit BafA1 (Spur 17-21) aufgetragen. Die Spuren 2, 7, 12 und 17 zeigen Zelllysate, die nach einer halben Stunde gewonnen wurden. Die Spuren 3, 8, 13 und 18 zeigen Zelllysate, die nach einer Stunde gewonnen wurden. Die Spuren 4, 9, 14 und 19 zeigen Zelllysate, die nach 2 h gewonnen wurden. Die Spuren 5, 10, 15 und 20 zeigen Zelllysate, die nach 4 h gewonnen wurden. Die Spuren 6, 11, 16 und 21 zeigen Zelllysate, die nach 8 h gewonnen wurden. Als Referenz für die Intensität diente die Bande der Positivkontrolle.

In Abb. 26 sind die Differenzen unter den verschiedenen Bedingungen gegen die Zeit aufgetragen.

Dabei zeigt sich, dass der Autophagieflux in Anwesenheit von bpV(OH)pic über 8 h sowohl unter Hunger- als auch unter „Normal“-Bedingungen ansteigt. Dieser Anstieg ist für Hungerbedingungen stärker als für die Kultur in DMEM. In den ersten zwei Stunden des Versuchs ist der Autophagieflux unter Hungerbedingungen niedriger als unter „Normal“-Bedingungen, später, bedingt durch den höheren Anstieg, ist er höher.

Die Differenz im Autophagieflux zwischen den unterschiedlichen Bedingungen ist nach 8 h am größten.

Verlauf des Autophagieflux mit bpV(OH)pic über 8 h in N2A - LC3B

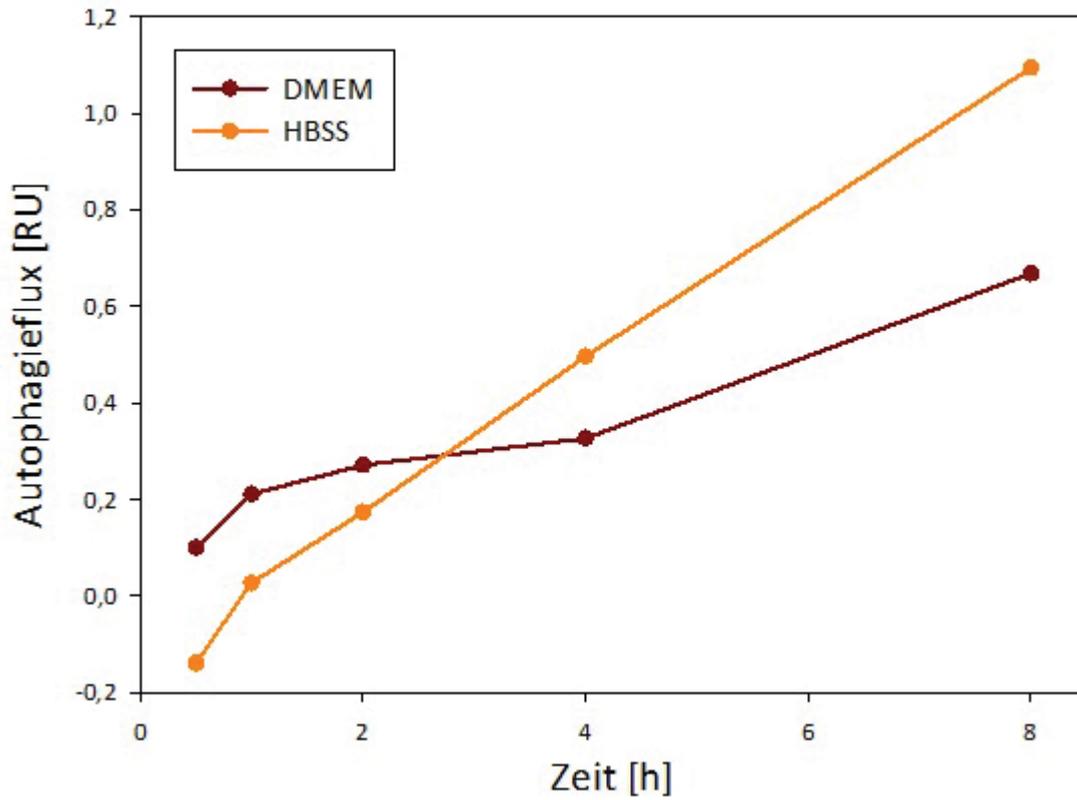


Abb. 26) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von bpV(OH)pic. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Der Anstieg des Autophagieflux bei Kultur in DMEM (rot) ist weniger stark als der bei Kultur in HBSS (orange).

3.2.2 Zeitreihe mit Calyculin A

In Abb. 27 ist die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Anwesenheit von Calyculin A unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt.

Sowohl bei Inkubation in DMEM als auch in HBSS steigt der Autophagieflux über 8 h an. Der Anstieg unter Hungerbedingungen ist stärker als in DMEM und erreicht nach 4 h ein gleichbleibendes Niveau. In DMEM steigt der Autophagieflux während der gesamten Versuchsdauer an.

Der Unterschied im Autophagieflux zwischen den unterschiedlichen Bedingungen ist nach 4 h am größten.

Verlauf des Autophagieflux mit Calyculin A über 8 h in N2A - LC3B

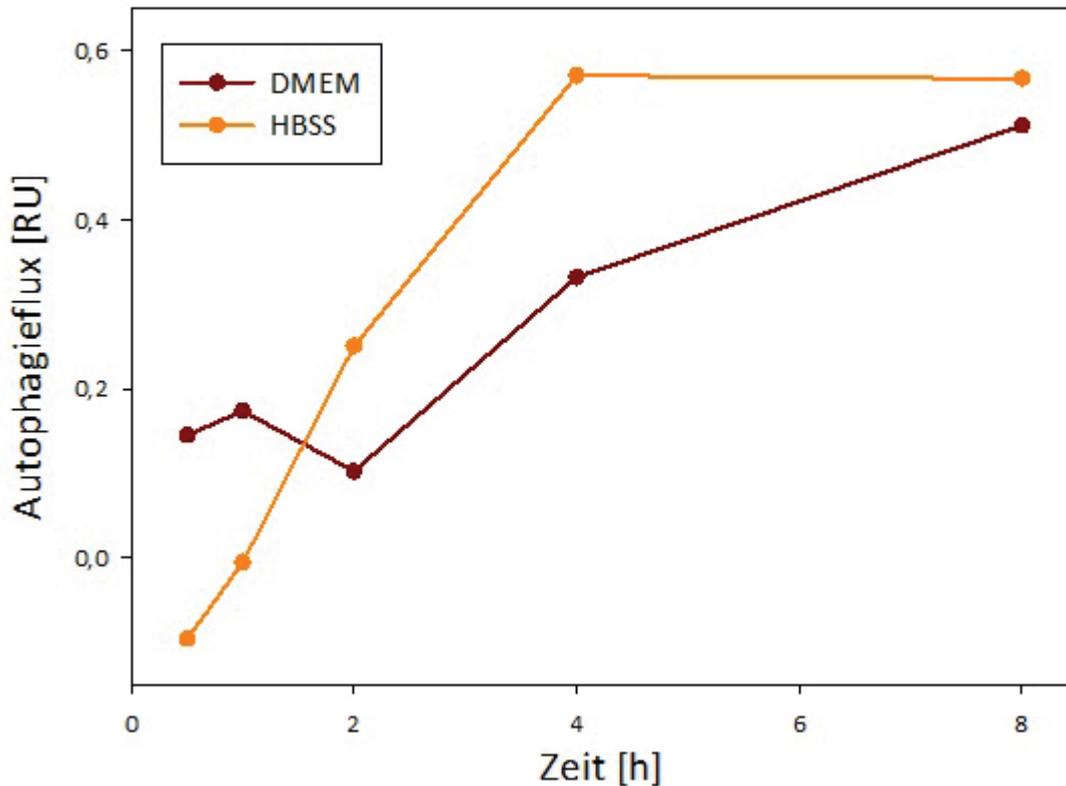


Abb. 27) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Calyculin A. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Unter Hungerbedingungen (orange) steigt der Autophagieflux bis zum Zeitpunkt 4 h an und bleibt dann bis 8 h auf einem ähnlichen Level. Bei Inkubation in DMEM (rot) steigt der Autophagieflux bis zum Zeitpunkt 8 h an.

3.2.3 Zeitreihe mit Ceramid C6

In Abb. 28 ist die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Anwesenheit von Ceramid C6 unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt.

Der Autophagieflux steigt unter beiden Kulturbedingungen an, wobei der Anstieg unter Hungerbedingungen deutlich stärker ausfällt als unter Inkubation mit DMEM. Besonders zwischen 2 h und 4 h Inkubation ist dieser Anstieg deutlich, während sich der Kurvenverlauf davor und danach sowohl mit DMEM als auch mit HBSS gleicht. Während der gesamten Versuchsdauer ist jedoch ein Anstieg des Autophagieflux zu beobachten.

Der Unterschied im Autophagieflux zwischen den unterschiedlichen Bedingungen ist nach 4 h bzw. 8 h am größten.

Verlauf des Autophagieflux mit Ceramid C6 über 8 h in N2A - LC3B

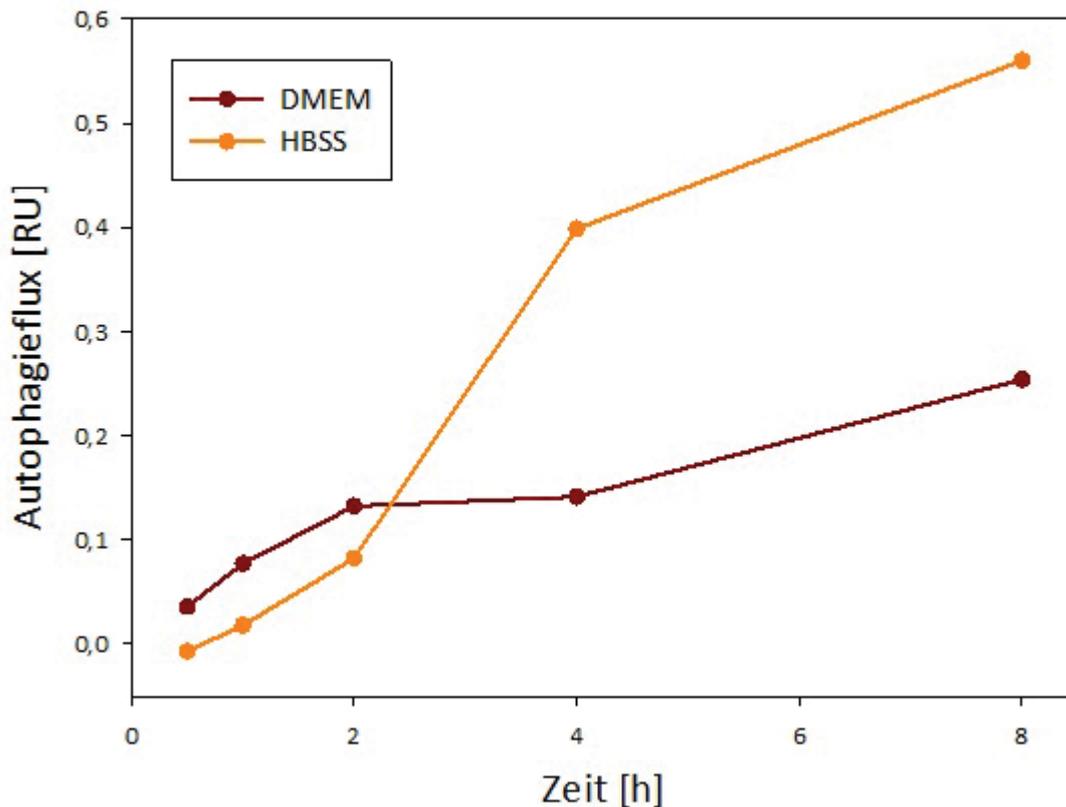


Abb. 28) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Ceramid C6. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Unter Hungerbedingungen (orange) steigt der Autophagieflux etwa zweieinhalbmal so stark wie unter Inkubation mit DMEM (rot). Vor allem zwischen 2 h und 4 h ist der Anstieg des Autophagieflux gegenüber dem in DMEM erhöht.

3.2.4 Zeitreihe mit Cypermethrin

In Abb. 29 ist die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Anwesenheit von Cypermethrin unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt. Unter beiden Kulturbedingungen steigt der Autophagieflux im Versuchsverlauf an. Der Anstieg bei Inkubation mit DMEM ist dabei jedoch wesentlich stärker, insbesondere in den ersten 4 h, bevor er dann bis 8 h ein etwa konstantes Niveau erreicht. Unter Hungerbedingungen bleibt der Autophagieflux in den ersten 4h relativ niedrig und steigt erst nach 8 h.

Die Ergebnisse für Cypermethrin unterscheiden sich hier von den übrigen bisher dargestellten Ergebnissen, indem der Autophagieflux unter Hungerbedingungen weniger stark ansteigt als bei Inkubation mit DMEM.

Der Unterschied im Autophagieflux zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen ist nach 4 h am größten.

Verlauf des Autophagieflux mit Cypermethrin über 8 h in N2A - LC3B

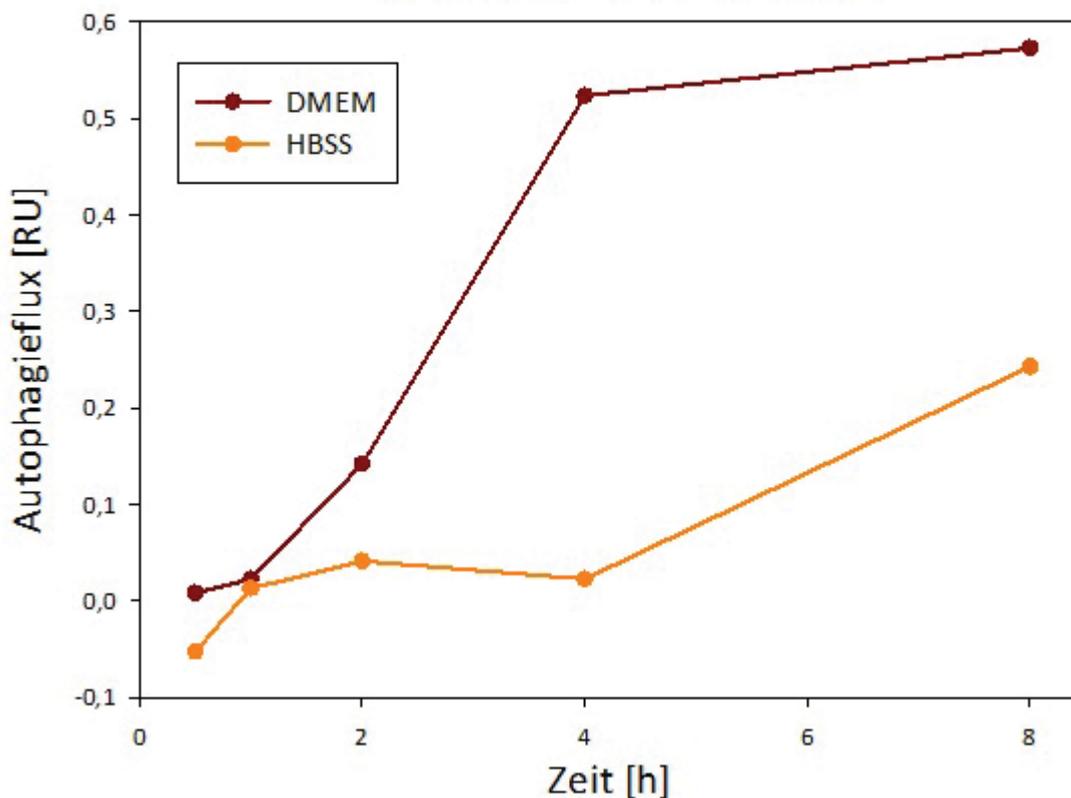


Abb. 29) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Cypermethrin. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Im Versuchsverlauf steigt der Autophagieflux sowohl bei Inkubation mit DMEM (rot) als auch bei Inkubation mit HBSS (orange). Während der ersten 4 h steigt der Autophagieflux für Inkubation mit DMEM sehr stark und erreicht dann bis 8 h ein konstantes Niveau. Der Autophagieflux ist unter Hungerbedingungen besonders in den ersten 4 h niedrig, bevor er nach 8 h ansteigt.

3.2.5 Zeitreihe mit Ethyl-3,4-dephostatin

In Abb. 30 ist die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Anwesenheit von Ethyl-3,4-dephostatin unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt.

Bis zum Zeitpunkt 4 h steigt der Autophagieflux unter beiden Kulturbedingungen an. Unter Hungerbedingungen sinkt er jedoch bei 8 h wieder. Bei Inkubation in DMEM steigt er weiter an. Während der ersten 4 h ist der Anstieg unter Hungerbedingungen stärker als bei Inkubation in DMEM.

Die Differenz des Autophagieflux zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen ist nach 8 h am größten.

Insgesamt liegen die Werte für den Autophagieflux (also für die Intensitätsdifferenz) hier deutlich niedriger als bei den bisher dargestellten Ergebnissen.

Verlauf des Autophagieflux mit Ethyl-3,4-dephostatin über 8 h in N2A - LC3B

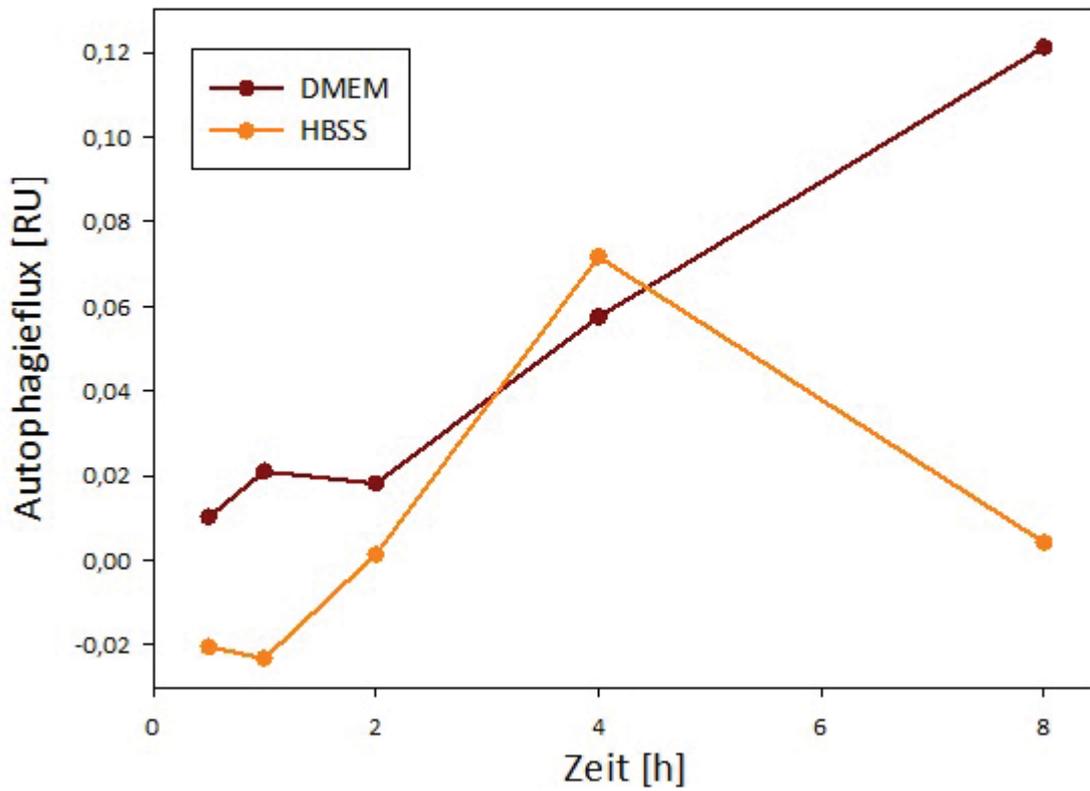


Abb. 30) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Ethyl-3,4-dephostatin. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Bis zum Zeitpunkt 4 h steigt der Autophagieflux sowohl unter Hunger- (orange) als auch unter „Normal“-Bedingungen (rot) an. Bei Inkubation mit HBSS sinkt der Autophagieflux nach 8 h wieder bis fast auf das Ausgangsniveau ab während er bei Inkubation in DMEM weiter ansteigt.

3.2.6 Zeitreihe mit PTP-Inhibitor II

In Abb. 31 ist die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Anwesenheit von PTP-Inhibitor II unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt. Bei Inkubation mit DMEM bleibt der Autophagieflux während der Inkubation auf einem niedrigen Niveau. Unter Hungerbedingungen nimmt er über 8 h leicht ab, bleibt aber immer über dem Niveau des Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM.

Die Differenz des Autophagieflux zwischen den unterschiedlichen Kulturbedingungen ist nach 0,5 h und nach 4 h am größten.

Die Werte für den Autophagieflux liegen im Vergleich mit den bisher dargestellten Ergebnissen in einem sehr niedrigen Bereich (etwa hundertfach niedriger).

Verlauf des Autophagieflux mit PTP-Inhibitor über 8 h in N2A - LC3B

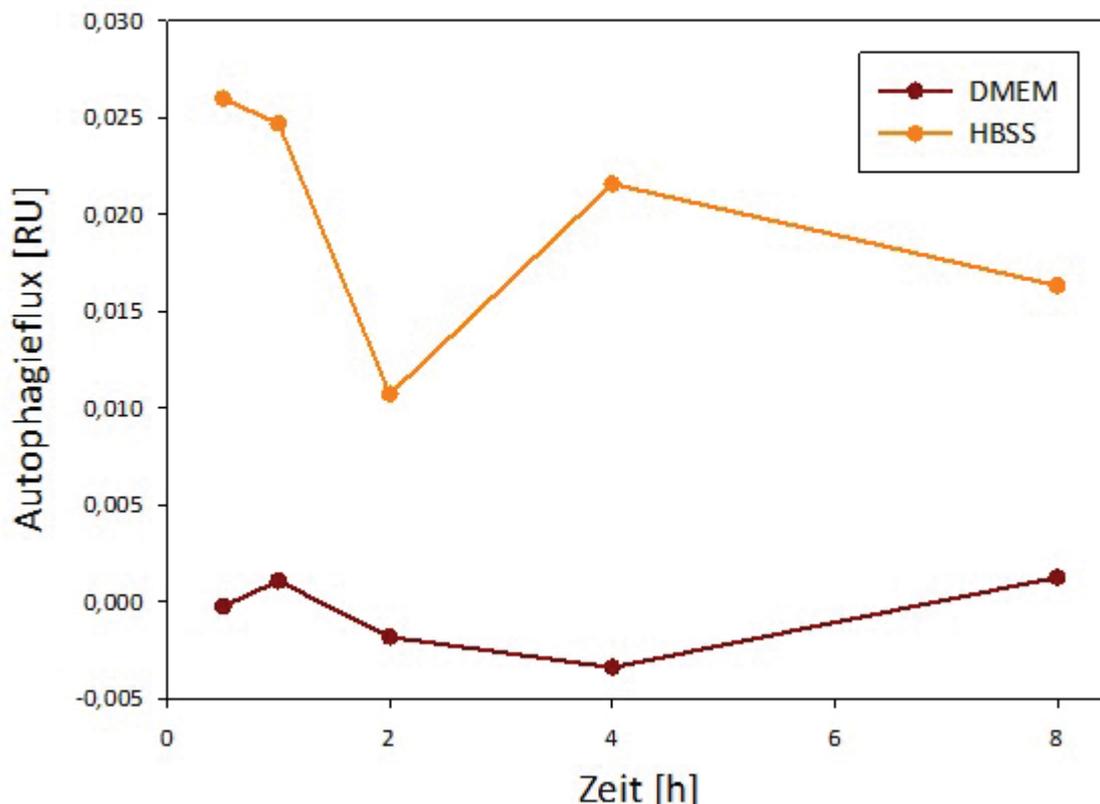


Abb. 31) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von PTP-Inhibitor II. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Der Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM (rot) bleibt während der 8 h Inkubationszeit etwa konstant und sehr niedrig. Etwas höher und im Verlauf der Inkubation abnehmend ist der Autophagieflux unter Hungerbedingungen (orange).

3.2.7 Zeitreihe mit Tautomycetin

In Abb. 32 ist die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Anwesenheit von Tautomycetin unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt.

Bei der Inkubation mit DMEM kann bis zum Zeitpunkt 4 h ein Anstieg des Autophagieflux beobachtet werden. Nach 8 h erreicht dieser jedoch wieder das Niveau vom Zeitpunkt 0,5 h. Unter Hungerbedingungen nimmt der Autophagieflux bis zum Zeitpunkt 1 h ab, steigt dann jedoch an und erreicht nach 4 h einen Höhepunkt. Dann nimmt er bis 8 h wieder leicht ab. Die Differenz des Autophagieflux unter den verschiedenen Kulturbedingungen ist nach 1 h und nach 8 h am größten.

Die absoluten Werte sind, wie für Ethyl-3,4-dephostatatin und PTP-Inhibitor II, verglichen mit denen für die anderen Modulatoren, niedrig.

Verlauf des Autophagieflux mit Tautomycetin über 8 h in N2A - LC3B

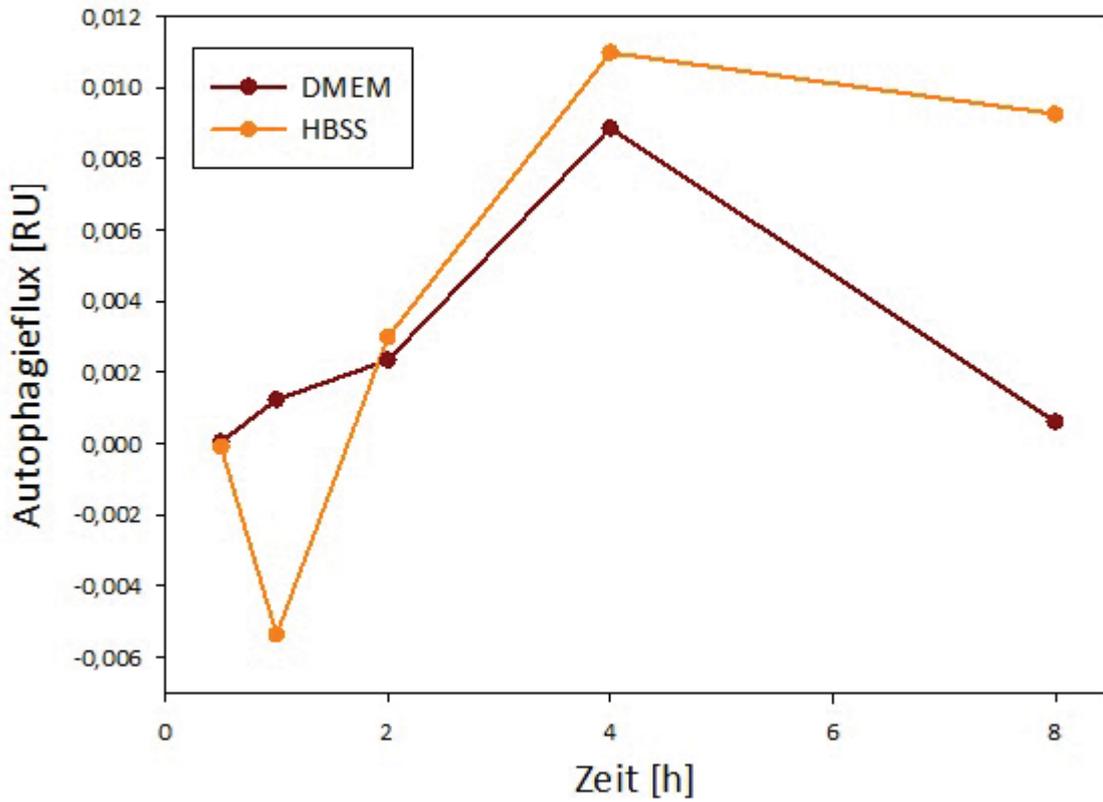


Abb. 32) Veränderung des Autophagieflux in Anwesenheit von Tautomycetin. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit mit dem Modulator aufgetragen. Bis zum Zeitpunkt 4 h verläuft die Veränderung des Autophagieflux in beiden Kulturbedingungen (DMEM in rot, HBSS in orange) etwa ähnlich. Unter Hungerbedingungen nimmt er nach 1 h stark ab, bis 4 h steigt er jedoch stetig an. Nach 8 h Inkubation nimmt der Autophagieflux wieder ab, bei Inkubation mit DMEM stärker als unter Hungerbedingungen.

3.2.8 Zeitreihe ohne Phosphatasemodulator

In Abb. 33 ist der die Veränderung des Autophagieflux über 8 h Inkubation in Abwesenheit von Phosphatasemodulatoren unter regulären Kulturbedingungen und Hungerbedingungen dargestellt.

Bei beiden Kulturbedingungen nimmt der Autophagieflux während der gesamten Inkubationszeit zu. Unter Hungerbedingungen steigt er vor allem in den ersten 4 h stark an, bei der Inkubation mit DMEM etwas schwächer. Nach 8 h ist das Niveau des Autophagieflux bei der Inkubation mit DMEM etwa halb so hoch wie unter Hungerbedingungen.

Die Differenz des Autophagieflux zwischen den unterschiedlichen Bedingungen ist nach 4 h und 8 h am größten.

Verlauf des Autophagieflux ohne Modulator über 8 h - LC3B

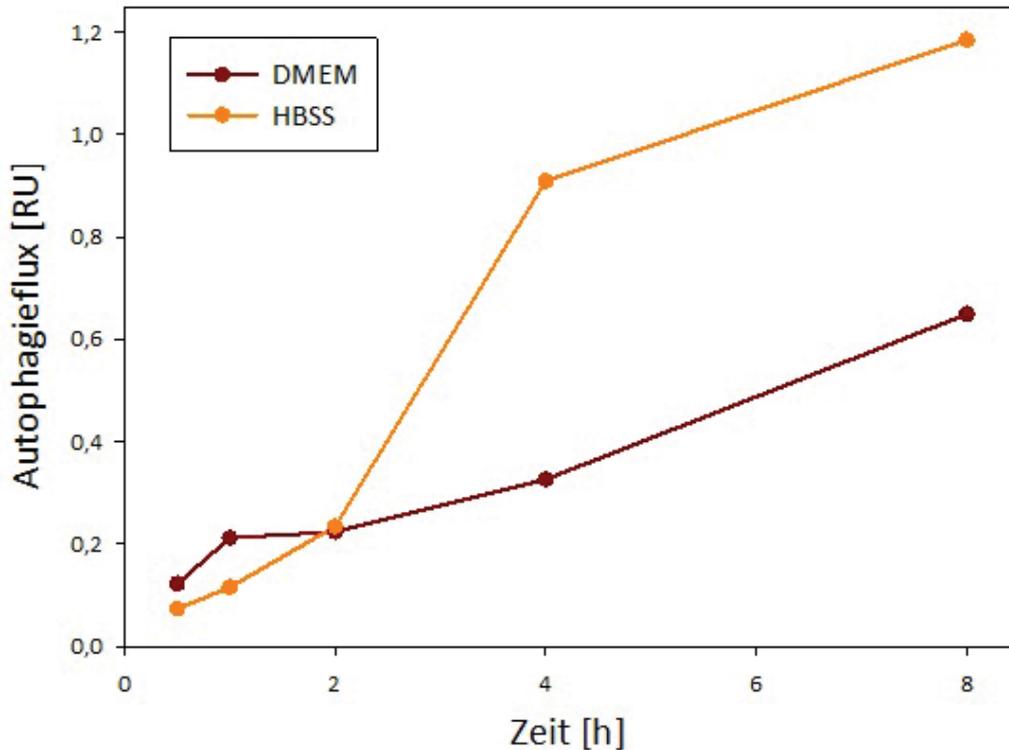


Abb. 33) Veränderung des Autophagieflux in Abwesenheit von Phosphatasemodulatoren. Die Differenz der Bandenintensität als Maß des Autophagieflux ist gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Der Autophagieflux steigt bei Inkubation in DMEM (rot) im gesamten Versuchsverlauf an. Unter Hungerbedingungen nimmt er vor allem in den ersten 4 h stark zu, und steigt dann bis 8 h noch einmal.

3.2.9 Zeitreihen mit den übrigen Modulatoren

Die Western-Blots der übrigen Phosphatasemodulatoren zeigten in manchen Spuren keine Banden oder Banden sehr niedriger Intensität, so dass eine Auswertung dieser Zeitreihen nicht möglich war.

3.2.10 Zusammenfassung der Zeitreihenexperimente

Die Differenz des Autophagieflux zwischen Hunger- und „Normal“-Bedingungen war bei den Experimenten mit den unterschiedlichen Phosphatasemodulatoren in den meisten Fällen nach 4 h am größten. In der Folge wurde dieser Zeitpunkt für weitere Experimente gewählt, um die Effekte der Zugabe der Phosphatasemodulatoren genauer untersuchen zu können.

3.3 Phosphatasemodulator-Experimente zum Zeitpunkt 4 h

Dieses Kapitel dient der Darstellung, Beschreibung und Auswertung der Phosphatasemodulator-Experimente, in denen die N2A-Zellen für 4 h gemeinsam mit den Modulatoren inkubiert wurden.

Zuerst werden die Western-Blots für LC3B und im Anschluss die für GABARAP gezeigt und besprochen. Neben der Darstellung der Western-Blots erfolgt auch eine grafische Aufarbeitung der Ergebnisse, die die Effekte der Modulatoren verdeutlicht.

3.3.1 Phosphatasemodulator-Experimente - LC3B

3.3.1.1 Phosphatasemodulator-Experimente - ohne Modulator

Abb. 34 zeigt den Western-Blot, mit den Banden, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation ohne Behandlung mit einem Phosphatasemodulator (siehe Kapitel 2.2.5.3) sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die Spuren 1 und 8 zeigen den Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder). Die neunte Spur zeigt für die Positivkontrolle mit rekombinantem LC3B-Protein eine Bande in Höhe von etwa 15 kDa. Das ist die Höhe, in der man eine Bande für LC3B etwa erwarten würde.

In den übrigen Spuren (Spur 2-7) sind die Proben der unterschiedlichen Versuchsbedingungen aufgetragen. Diese weisen jeweils in Höhe von 17 kDa und in Höhe von 15 kDa Banden auf. Diese entsprechen dem unlipidierten bzw. dem lipidierten LC3B-Protein. In den Spuren, in denen die Zelllysate der Zellen aufgetragen sind, die mit BafA1 inkubiert wurden (Spur 3 und 5), gibt die untere Bande ein stärkeres Signal als die untere Bande in den entsprechenden Spuren für die Zelllysate der Zellen, die ohne BafA1 inkubiert wurden. Das entspricht den Erwartungen, da BafA1 die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom verhindert und sich so in Anwesenheit von BafA1 die lipidierte (also die im Autophagosom vorliegende) Form in den Zellen anreichern sollte. Dies scheint hier der Fall zu sein. In N2A-Zellen liegt also ein basaler Autophagiefluss vor. Aus der Intensität der Signale für diese Banden wurde nun die Differenz gebildet. Dieser Versuch wurde mehrmals durchgeführt. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit den Phosphatasemodulatoren ist der Autophagiefluss ohne Zugabe von Phosphatasemodulatoren in Abb. 46 grafisch dargestellt.

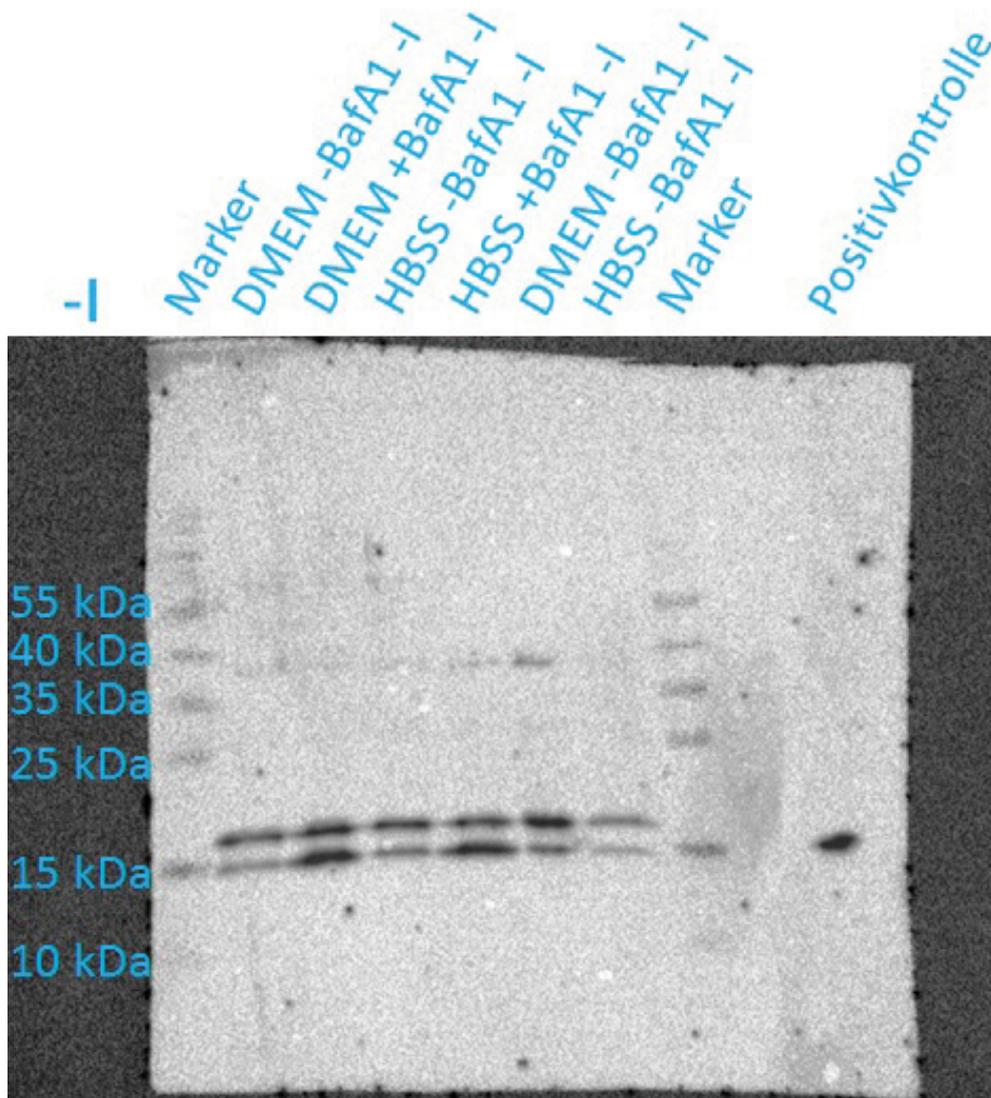


Abb. 34) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen ohne Modulator (-I). Die Marker-Spuren liefern einen Größenstandard (Beschriftung links). Auf Höhe von ca. 15 kDa befindet sich in der Spur der Positivkontrolle eine einzelne Bande für LC3B. In den übrigen Spuren finden sich zwei Banden für die unlipidierte Form (bei 17 kDa) und die lipidierte Form (bei 15 kDa) von LC3B.

3.3.1.2 Phosphatasemodulator-Experimente - bpV(OH)pic

Abb. 35 zeigt den Western-Blot, mit den Banden, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit bpV(OH)pic sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die ersten beiden Spuren zeigen den Proteinstandard, die letzte (Spur 9) eine einzelne Bande für rekombinantes LC3B als Positivkontrolle. Auf die übrigen Spuren wurden die Zelllysate der unterschiedlich behandelten Zellen aufgetragen. In den Spuren 3-5 sind nur sehr schwache Banden für LC3B zu erkennen; diese konnten jedoch mit der Software ImageLab als solche identifiziert werden. In der sechsten Spur zeigt sich eine Bande hoher Intensität für die lipidierte Form von LC3B. Die Aktivierung des Autophagieflusses scheint bei Stimulation durch Hunger unter Einfluss von bpV(OH)pic also stark erhöht zu sein.

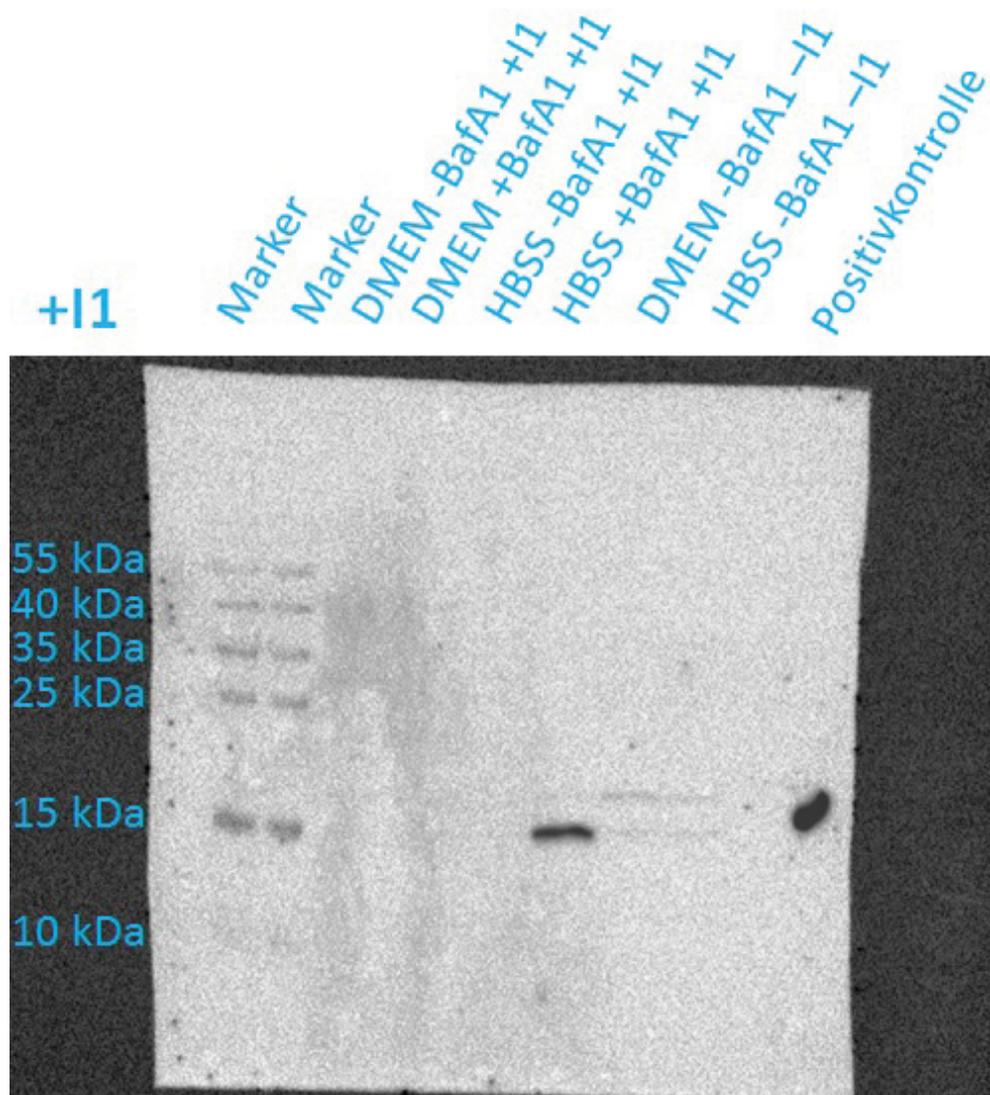


Abb. 35) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit bpV(OH)pic (+I1).

3.3.1.3 Phosphatasemodulator-Experimente - Calyculin A

Abb. 36 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Calyculin A sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

In der ersten und neunten Spur ist der Proteinstandard aufgetragen, in der achten Spur die Positivkontrolle, die eine einzelne Bande für rekombinantes LC3B zeigt. Die Zelllysate der unterschiedlich behandelten Zellen sind auf den restlichen Spuren aufgetragen. Hier zeigen sich vor allem in den Spuren der mit BafA1 behandelten Zellen (Spur 3 und 5) für lipidiertes LC3B Banden stärkerer Intensität als für die entsprechenden Spuren der ohne BafA1 inkubierten Zellen. Die Differenz der Banden für lipidiertes LC3B (also der Autophagiefluss) ist bereits optisch für die Zellen unter Hungerbedingungen als größer erkennbar als die bei Inkubation mit DMEM.

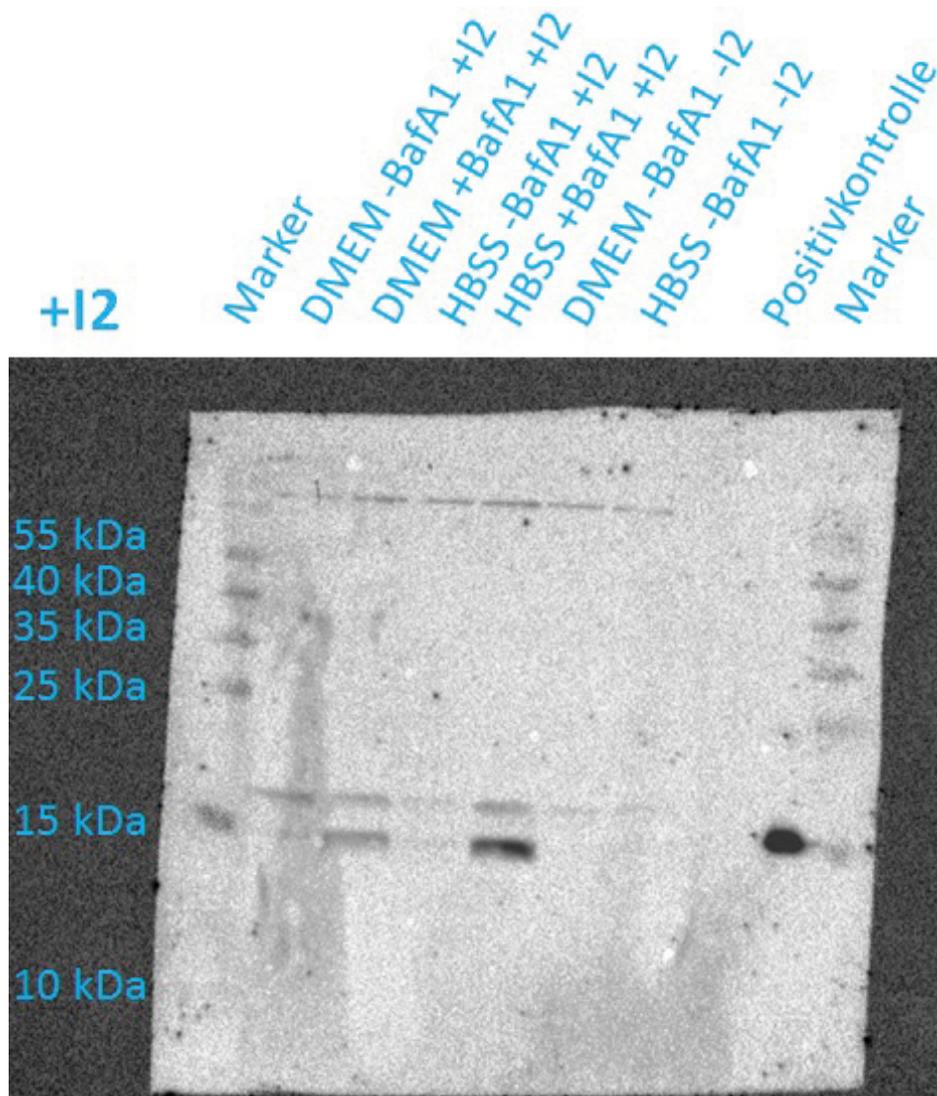


Abb. 36) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Calyculin A (+I2).

3.3.1.4 Phosphatasemodulator-Experimente - Ceramid C6

Abb. 37 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Ceramid C6 sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die erste und achte Spur zeigen die Banden des Proteinstandards, die neunte Spur die Positivkontrolle mit rekombinantem LC3B, bei der eine Bande sichtbar ist. Die Spuren auf die die Zelllysateproben aufgetragen wurden, zeigen jeweils zwei Banden für die lipidierte und unlipidierte Form von LC3B (Spuren 2, 4 und 6 nur unter Einsatz der ImageLab-Software). Die Banden für die lipidierte Form unter Einsatz von BafA1 bei der Inkubation weisen ein deutlich stärkeres Signal auf als die entsprechenden Proben ohne Einsatz von BafA1. Sie sind bei Inkubation mit DMEM und bei Inkubation mit HBSS etwa von gleicher Intensität.

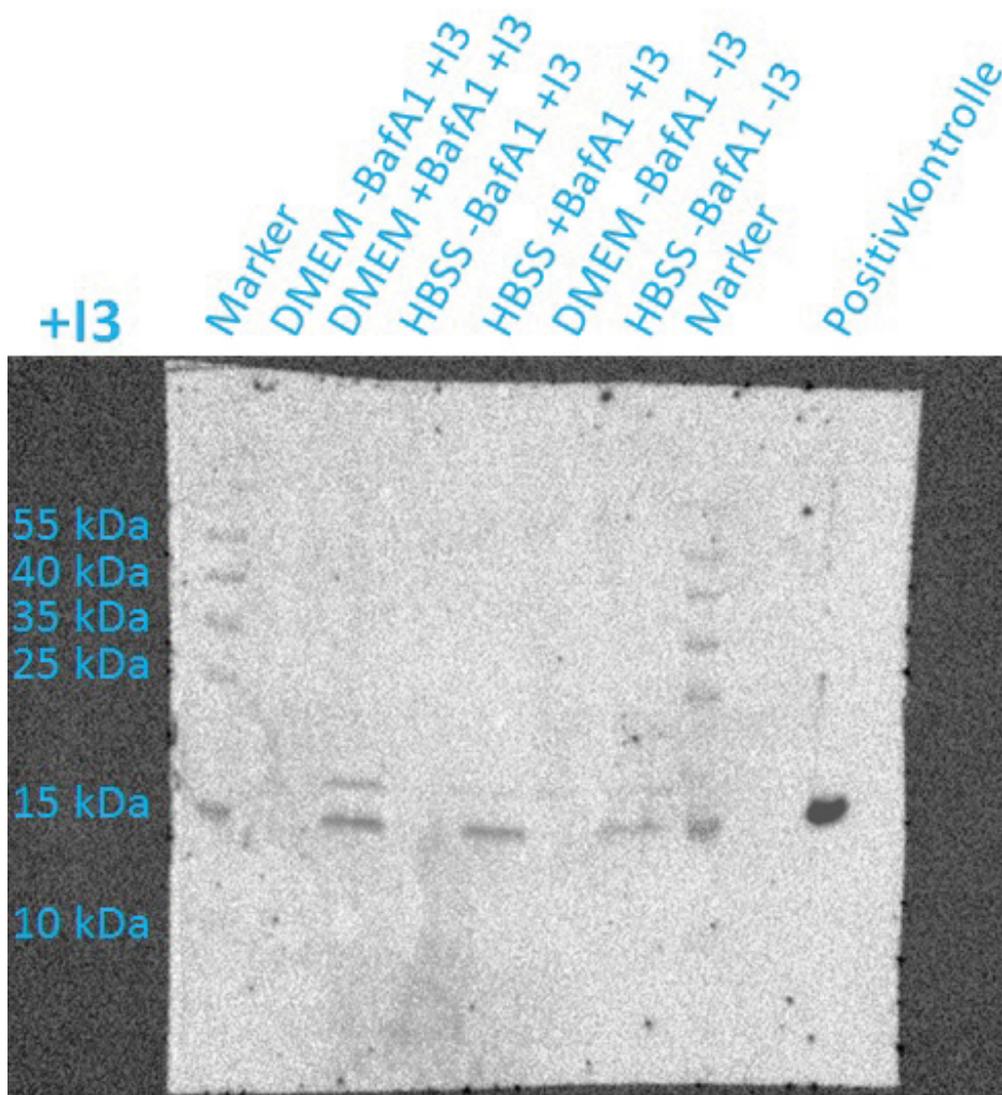


Abb. 37) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ceramid C6 (+I3).

3.3.1.5 Phosphatasemodulator-Experimente - Cypermethrin

Abb. 38 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Cypermethrin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Auf die Spuren 1 und 3 wurde der Proteinstandard aufgetragen, auf die neunte Spur die Positivkontrolle. In dieser Spur zeigt sich eine einzelne Bande bei etwa 15 kDa, die von rekombinantem LC3B stammt. Der Autophagieflux ist bei Inkubation mit HBSS im Gegensatz zur Inkubation mit DMEM erhöht. Die Bande für lipidiertes LC3B bei Behandlung der Zellen mit BafA1 ist unter Hungerbedingungen etwa doppelt so stark wie unter Inkubation mit DMEM, während die Bande für lipidiertes LC3B in Zellen, die nicht mit BafA1 behandelt wurden, für in DMEM und für in HBSS inkubierte Zellen eine ähnlich hohe Intensität aufweist.

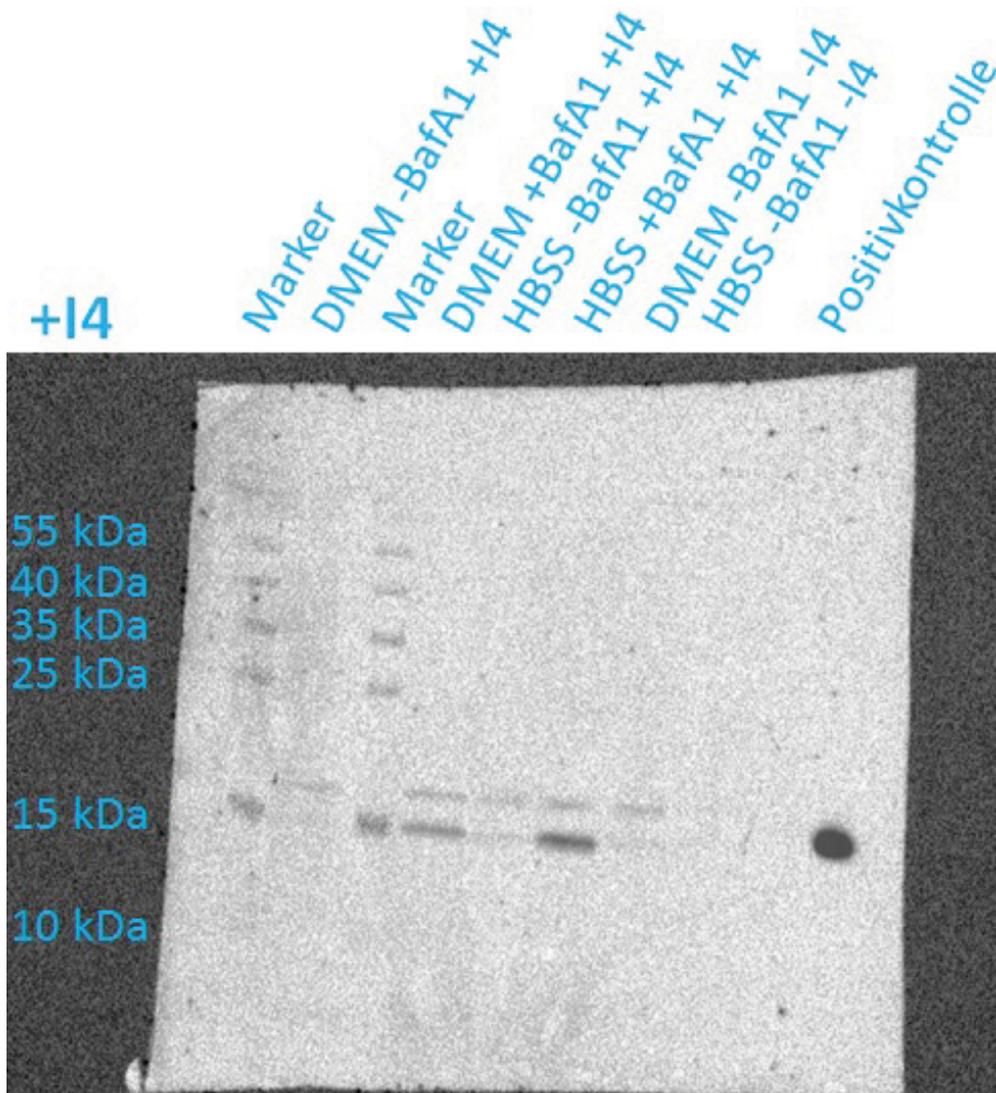


Abb. 38) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Cypermethrin (+I4).

3.3.1.6 Phosphatasemodulator-Experimente - Ethyl-3,4-dephostatin

Abb. 39 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die ersten beiden Spuren zeigen die Banden des Proteinstandards. In Spur 9 mit der Positivkontrolle zeigt sich eine, verglichen mit den übrigen Western-Blots, relativ schwache Bande für das rekombinante LC3B-Protein, während in den übrigen Spuren, auf die die Zelllysate aufgetragen wurden, jeweils deutlich zwei Banden für die beiden Formen von LC3B sichtbar sind. In diesen Spuren ist erneut zu beobachten, dass unter Verwendung von BafA1 im Medium der Zellen die Intensität der Bande der lipidierten Form höher ist als ohne BafA1 im Medium. Unter Hungerbedingungen ist die Differenz der Banden für lipidiertes LC3B größer als bei Inkubation mit DMEM, d.h. der Autophagieefflux ist höher.

Dass das Signal der Positivkontrolle relativ niedrig ist, kann verschiedene Gründe haben. So kann die Menge von LC3B in den Zellen im Vergleich zur Kontrolle tatsächlich höher sein als

bei Behandlung mit den übrigen Phosphatasemodulatoren. Das scheint aber deswegen nicht der Fall zu sein, weil das Verhältnis des Signals der auf die Spuren 7 und 8 aufgetragenen Zelllysate (in Abwesenheit von Ethyl-3,4-dephostatin) zur Positivkontrolle ähnlich dem auf den übrigen Western-Blots sein sollte. Auf diesen ist das Signal der LC3B-Banden aber meist niedriger als das der Bande des rekombinanten LC3B der Positivkontrolle (oder liegt auf einem ähnlich hohen Niveau).

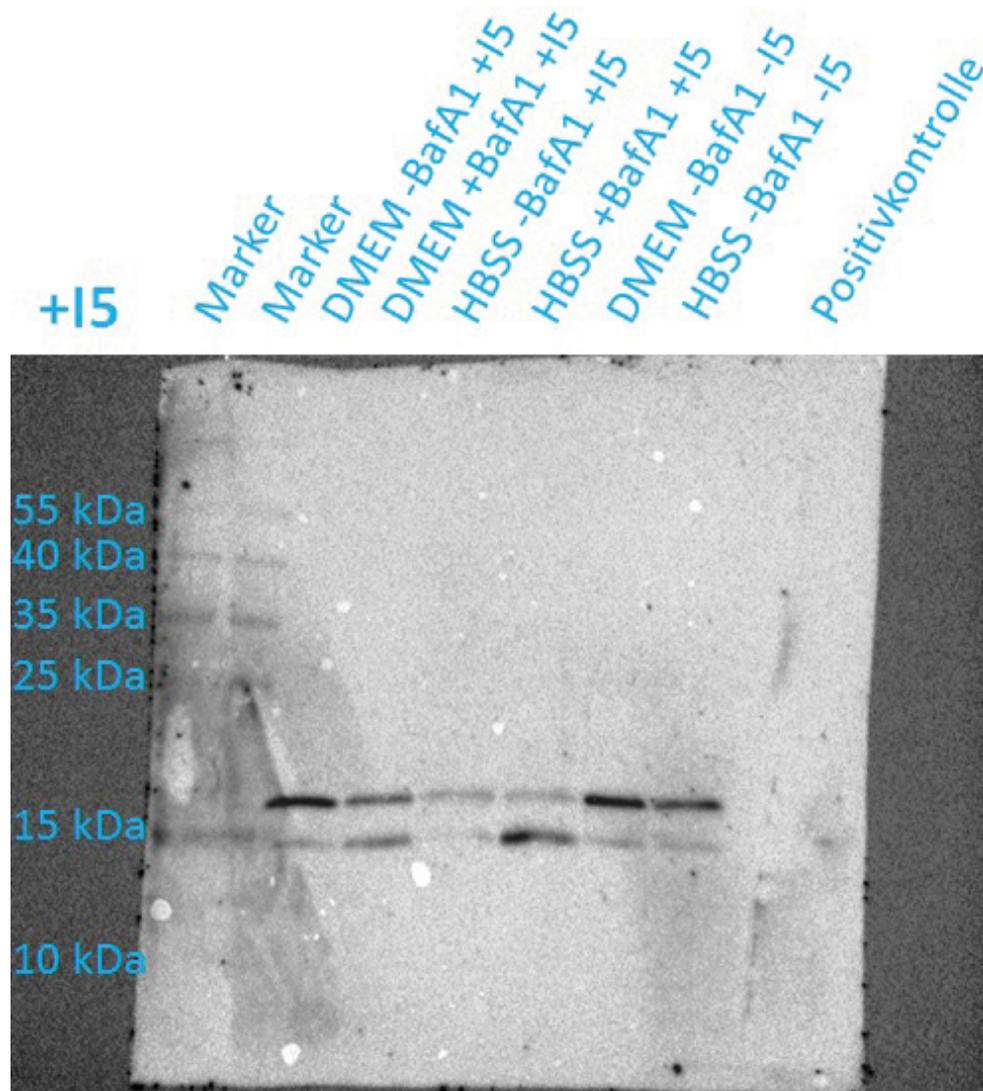


Abb. 39) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ethyl-3,4-dephostatin (+15).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass einer der Antikörper kaum an das Protein auf der Membran bzw. an den anderen Antikörper gebunden haben könnte, der „Fehler“ also im Versuchsablauf liegt. Da diese Bande, um die Western-Blots vergleichen zu können, auch hier als Referenz dient, sind die resultierenden Werte für die darauf bezogene Intensität (und damit auch die Differenz der Intensitäten, d.h. die Werte für den Autophagiefluss) gegenüber denen der übrigen Phosphatasemodulatoren deutlich erhöht. Das zeigt auch Abb. 46, in der diese Werte zum Vergleich der Modulatoren dargestellt sind.

3.3.1.7 Phosphatasemodulator-Experimente - Fostriecin

Abb. 40 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Fostriecin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

In der ersten und letzten Spur sind die Banden des Proteinstandards sichtbar. Auf Spur 8 wurde die Positivkontrolle (rekombinantes LC3B) aufgetragen. Hier zeigt sich eine einzelne Bande. Die übrigen Spuren mit den Zelllysaten zeigen jeweils zwei Banden, eine für die unlipidierte und eine für die lipidierte Form von LC3B. In Spur 3 und 5 (BafA1 im Medium) ist das Signal für lipidiertes LC3B stärker als in den Spuren 2 und 4 (kein BafA1 im Medium). Die Differenz (der Autophagieflux) zwischen den Banden der lipidierten Form ist unter Hungerbedingungen größer.

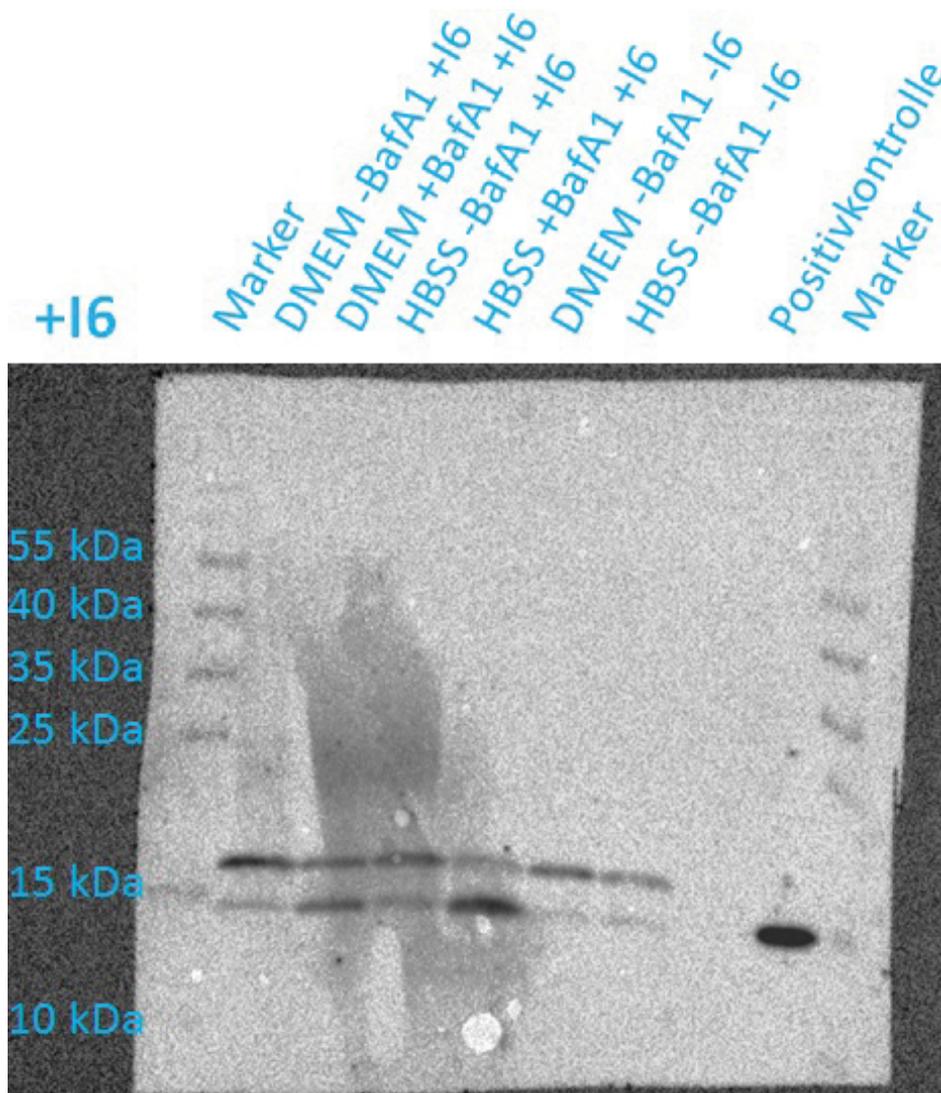


Abb. 40) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Fostriecin (+I6).

3.3.1.8 Phosphatasemodulator-Experimente - NaSb-Gluconat

Abb. 41 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit NaSb-Gluconat sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Auf die Spuren 1 und 8 wurde der Proteinstandard aufgetragen, auf die neunte Spur die Positivkontrolle. Bei dieser sieht man eine Bande, die vom rekombinanten LC3B stammt. In den übrigen Spuren zeigen sich jeweils zwei Banden. Diese stammen jeweils von unlipidiertem (obere Bande) und lipidiertem LC3B (untere Bande). In den Spuren 4 bis 7 sind die Banden sehr „wellig“. Das kann z.B. auf einer Verunreinigung der Zelllysate mit DNS beruhen. Evtl. war der Verdau von DNS im Zelllysate durch DNase nicht vollständig. Nichtsdestotrotz sind die Signale der Banden jedoch mit ImageLab quantifizierbar. Dabei ist die Differenz zwischen den Banden der lipidierten Form unter Hungerbedingungen größer als bei Inkubation der Zellen mit DMEM (Spur 2 und 3), bei der die Differenz (also der Autophagiefluss) sehr niedrig ist.

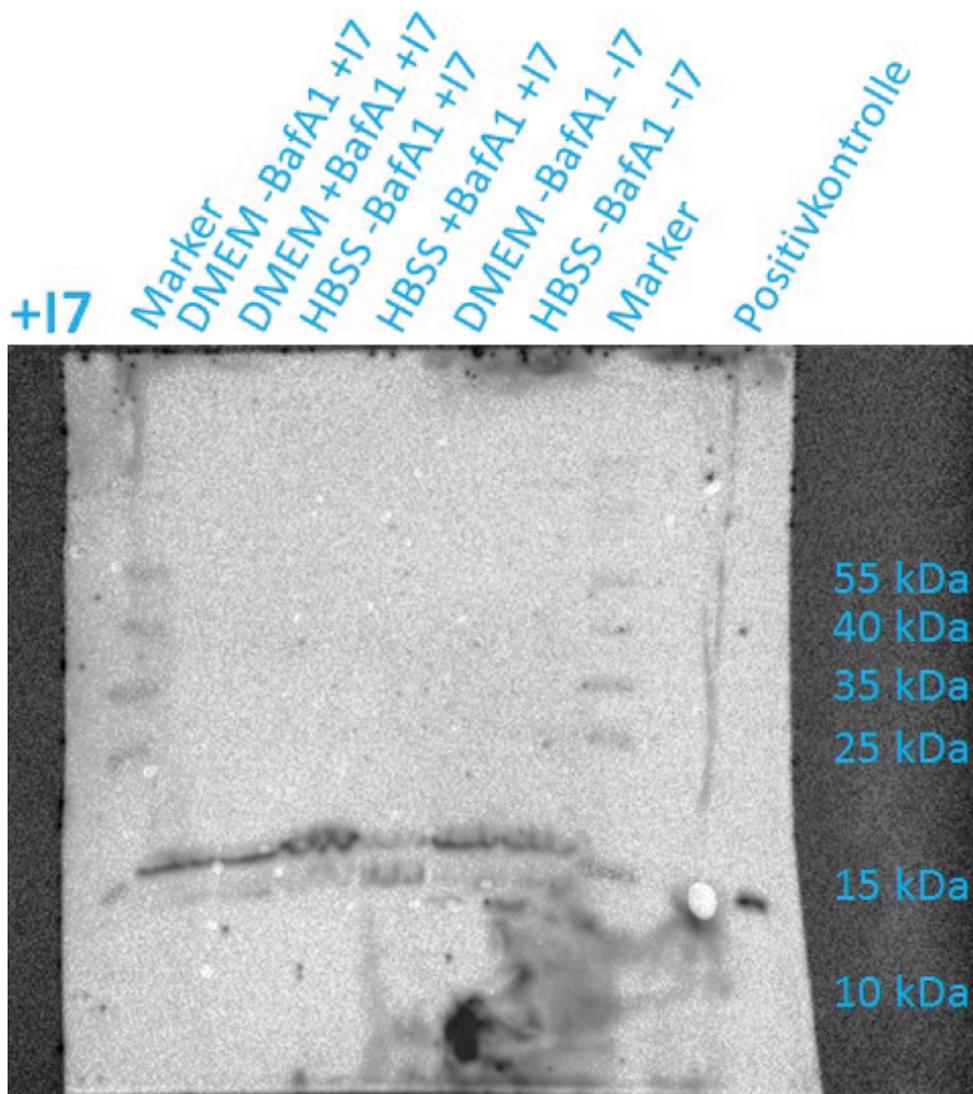


Abb. 41) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit NaSb-Gluconat (+17). Beschriftung des Größenstandards rechts.

3.3.1.9 Phosphatasemodulator-Experimente - Okadainsäure

Abb. 42 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Okadainsäure sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die Spuren 1 und 3 zeigen das Signal des Proteinstandards, die Spur 9 das der Positivkontrolle, eine Bande für rekombinantes LC3B. Die Banden in den Spuren, auf die die Zelllysate aufgetragen wurden sind, wie manche in Abb. 41, sehr „wellig“, aber auswertbar. Die Zelllysate für die Behandlung mit den jeweiligen Phosphatasemodulatoren wurden am gleichen Tag gewonnen und die SDS-PAGE und das Western-Blotting am gleichen Tag durchgeführt, so dass ein Problem beim Verfahren als gemeinsame Ursache nahelegt. Auch hier zeigt sich, dass die Intensität der Banden der Zelllysate der mit BafA1 behandelten Zellen (Spur 4 und 6) höher ist als die der Banden mit den entsprechenden Zelllysaten der unbehandelten Zellen (Spur 2 und 5). Die Differenz dieser Banden scheint bei Inkubation mit HBSS der bei Inkubation mit DMEM ähnlich zu sein.

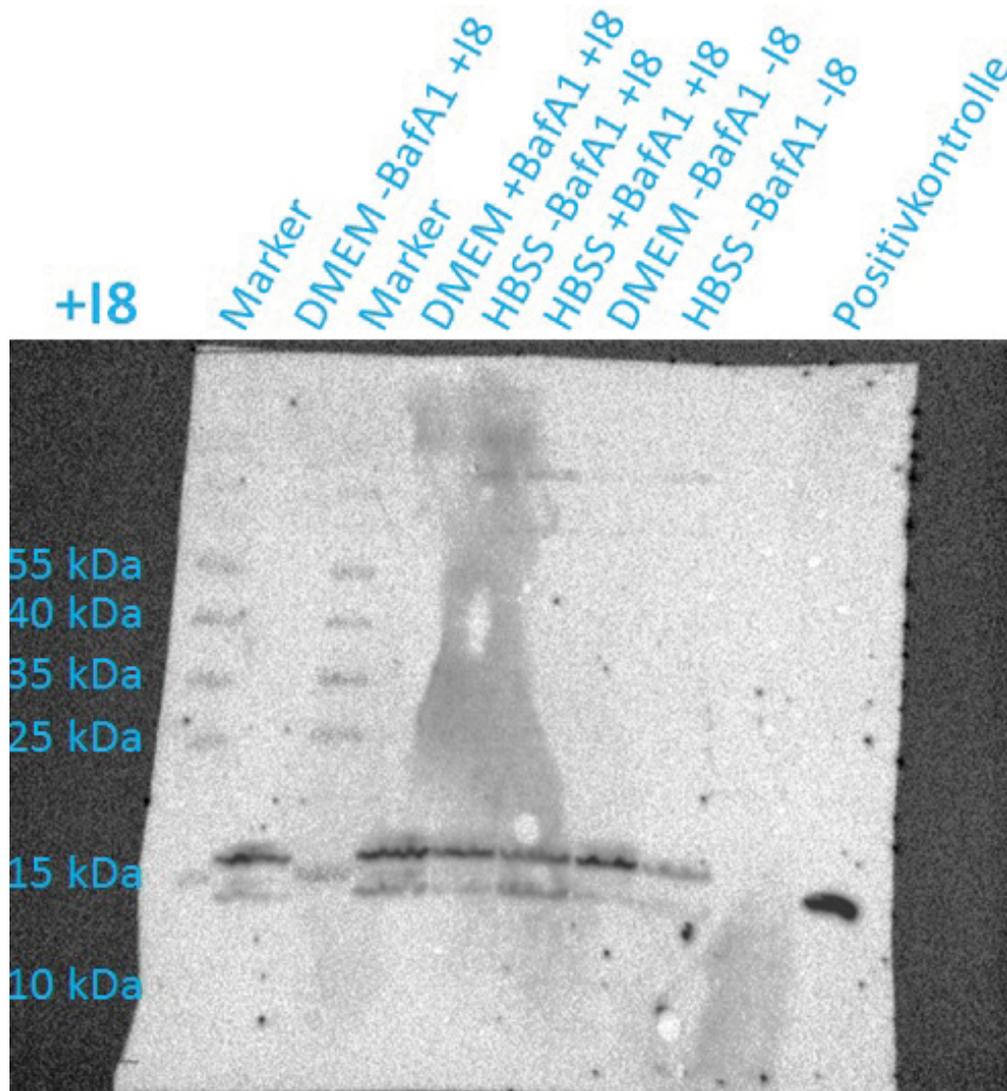


Abb. 42) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Okadainsäure (+18).

3.3.1.10 Phosphatasemodulator-Experimente - PTP-Inhibitor II

Abb. 43 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit PTP-Inhibitor II sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die ersten beiden Spuren zeigen die Banden des Proteinstandards. In der letzten Spur, auf die rekombinantes LC3B als Positivkontrolle aufgetragen wurde, ist eine einzelne Bande sichtbar. Die Banden der lipidierten Form von LC3B zeigen bei allen aufgetragenen Zelllysaten kaum einen Unterschied in ihrer Signalstärke. Der Autophagiefluss scheint unter Anwesenheit von PTP-Inhibitor II stark unterdrückt zu sein. Deutlich wurde bei der Gewinnung der Zelllysate, dass die Zellen nach vierstündiger Inkubation mit dem Modulator morphologische Anzeichen von zellulärem Stress und apoptotische Anzeichen zeigten (z.B. „Blebbing“, Ablösen vom Untergrund).

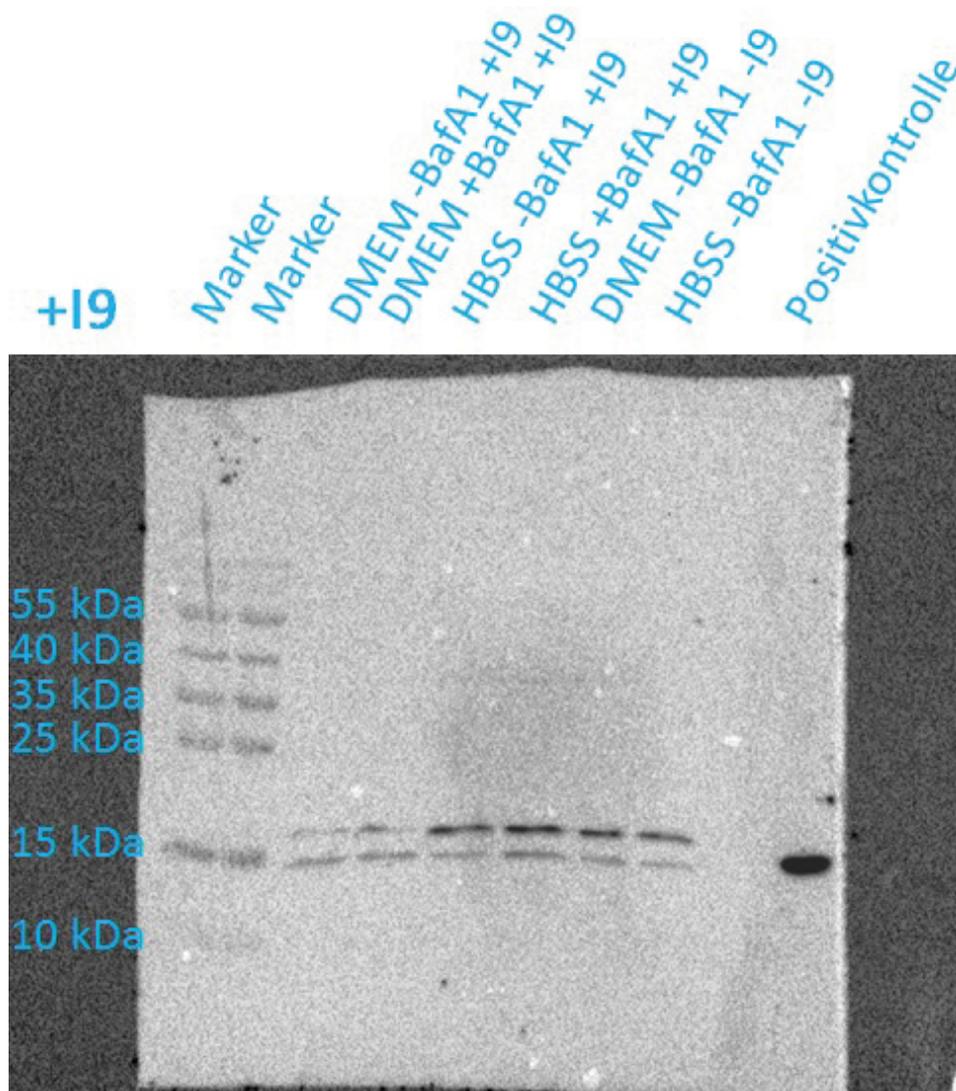


Abb. 43) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit PTP-Inhibitor II (+I9).

3.3.1.11 Phosphatasemodulator-Experimente - Tautomycetin

Abb. 44 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Tautomycetin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:200 ms-anti-LC3B in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-ms in TBST) der Membran sichtbar werden.

Auf Spur 1 und 9 wurde der Proteinstandard aufgetragen, auf Spur 8 die Positivkontrolle. Bei dieser zeigt sich eine Bande, die von LC3B stammt.

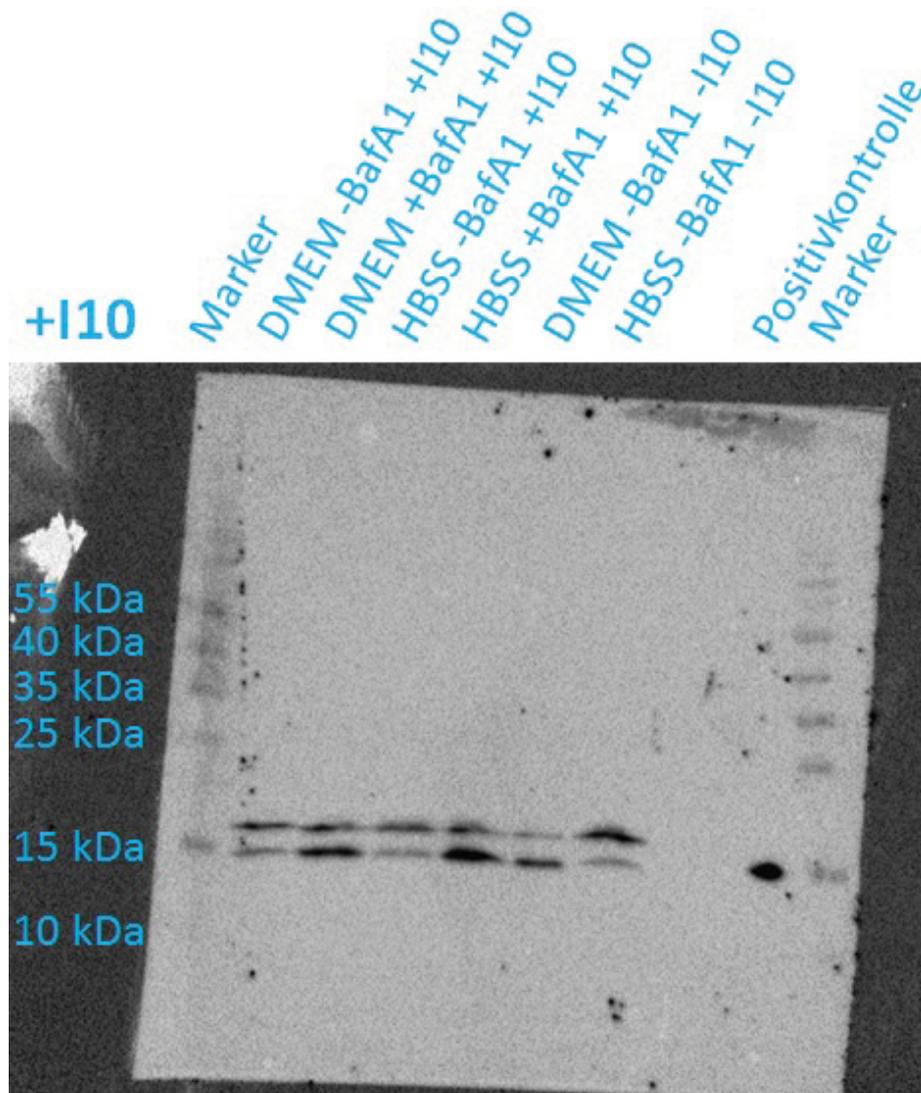


Abb. 44) Western-Blot von LC3B nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Tautomycetin (+I10). Die Marker-Spuren liefern einen Größenstandard (Beschriftung links). Auf Höhe von ca. 15 kDa befindet sich in der Spur der Positivkontrolle eine einzelne Bande für LC3B. Bei den übrigen Spuren wurden die Zelllysate der Kulturen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen aufgetragen.

In den Spuren, auf die die Zelllysate der Zellen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen aufgetragen wurden, sind die zwei Banden für lipidiertes und unlipidiertes LC3B sichtbar. Der Autophagiefluss ist bei Inkubation in HBSS im Vergleich zur Inkubation in DMEM leicht erhöht.

3.3.1.12 Zusammenfassung der Phosphatasemodulator-Experimente - LC3B

Abb. 45 zeigt Ausschnitte der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Western-Blots als eine Übersicht der Banden, die bei der Behandlung mit den verschiedenen Phosphatasemodulatoren auftreten.

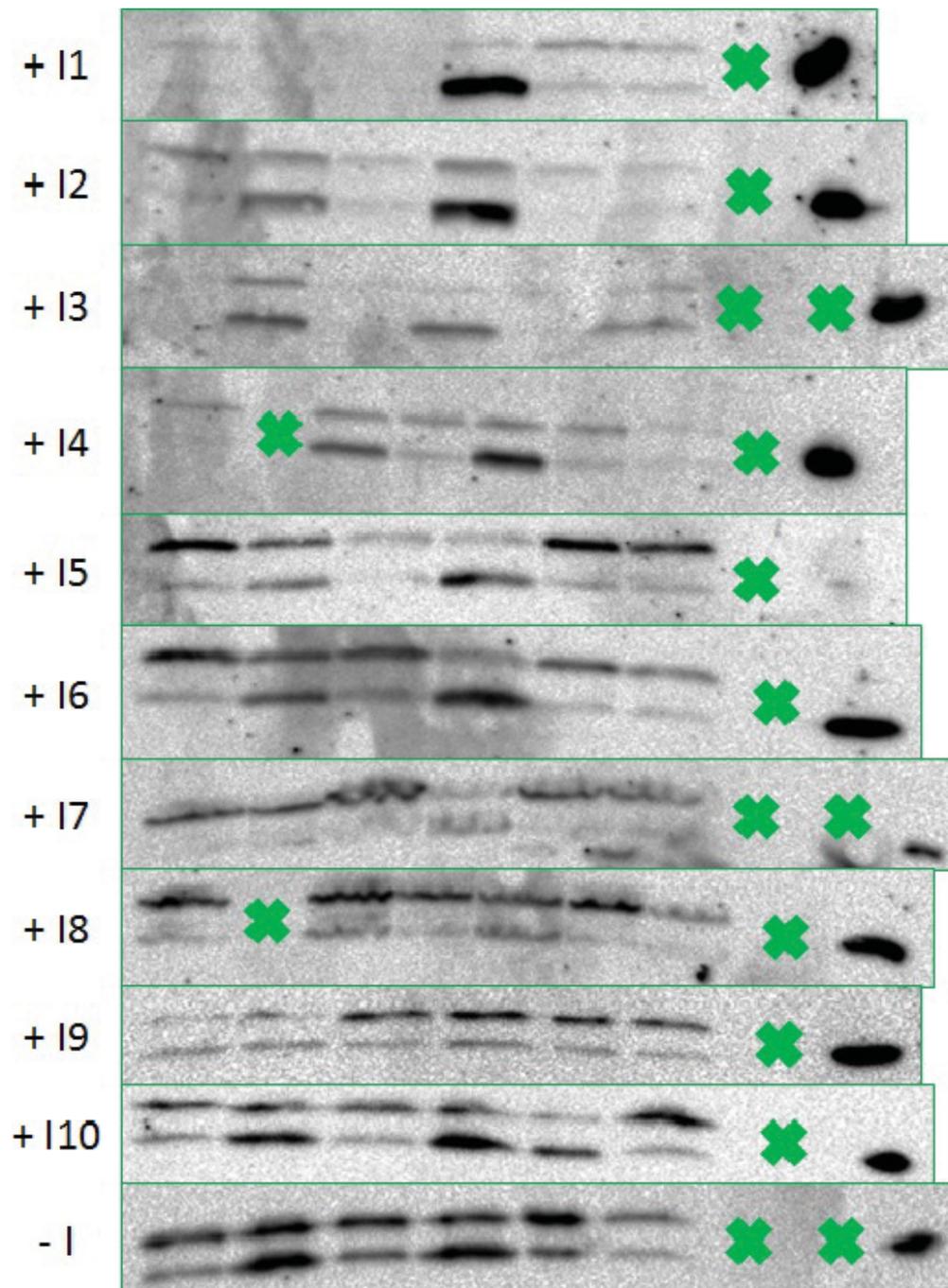


Abb. 45) Die Ergebnisse der Western-Blots für LC3B mit den verschiedenen Phosphatasemodulatoren auf einen Blick. Die Phosphatasemodulatoren sind von I1 bis I10 in alphabetischer Reihenfolge durchnummeriert. Die Nummer entspricht derjenigen auf den in den vorangegangenen Kapiteln gezeigten Western-Blots. - I entspricht der Behandlung der Zellen ohne Phosphatasemodulator. Die grünen Kreuze bedeuten, dass diese Spur leer gelassen wurde oder eine Spur war, auf der der Proteinstandard aufgetragen wurde.

In dieser Übersicht zeigt sich deutlich, dass die unterschiedlichen Phosphatasemodulatoren den Autophagiefluss auf verschiedene Art und Weise beeinflussen. Dazu kann man z.B. die Banden vergleichen, die sich für die Behandlung mit bpV(OH)pic (+ I1) und für die Behandlung mit Okadainsäure (+ I8) ergeben.

Da eine rein optische Betrachtung sehr ungenau ist, wurde die Signalstärke der Banden quantifiziert. Ein direkter Vergleich ist in Abb. 46 zu sehen.

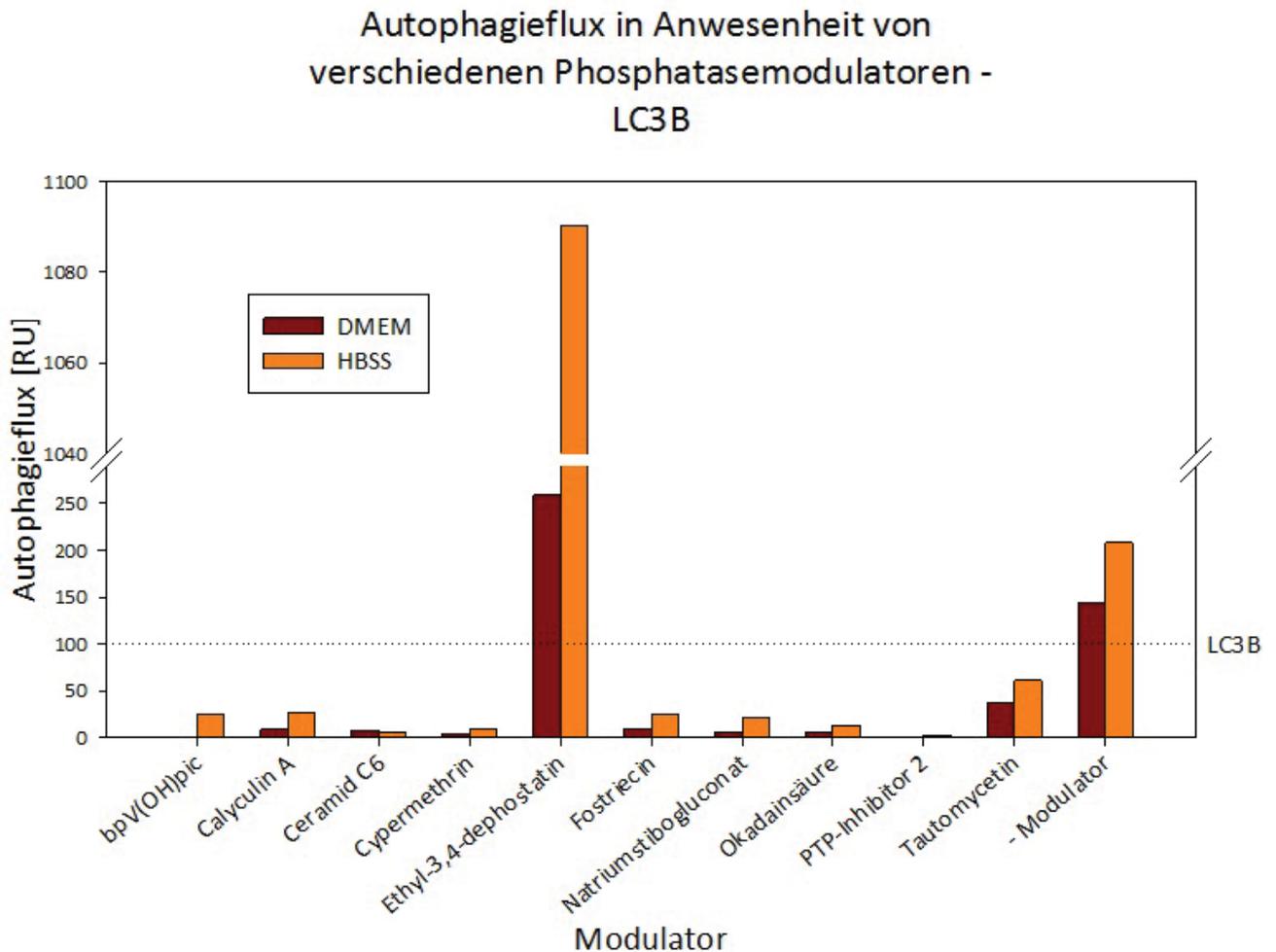


Abb. 46) Quantifizierung des Autophagieflux in Anwesenheit der verschiedenen Phosphatasemodulatoren – LC3B. Die Differenz der Intensitäten der Form-II-Banden (Autophagieflux) bei Inkubation der Zellen mit DMEM (rot) und mit HBSS (orange) werden verglichen. Die Signalstärke der LC3B-Bande der Positivkontrolle, die jeweils als Referenz für die Intensität herangezogen wurde, wird mit 100 angegeben.

Außer in Anwesenheit von Ceramid C6 war der Autophagieflux bei Hungerbedingungen mit allen Modulatoren und ohne Modulator im Vergleich zur Inkubation der Zellen in DMEM erhöht.

Die Werte von Ethyl-3,4-dephostatin sind aus den o.a. Gründen (siehe Kapitel 3.3.1.6) gegenüber den anderen stark erhöht.

Ansonsten fällt auf, dass die Werte für den Autophagieflux bezogen auf die Kontrolle ohne Phosphatasemodulator bei allen Modulatoren relativ niedrig sind.

Um einen Überblick auf die Auswirkung der Inkubation der N2A-Zellen mit den Modulatoren zu erhalten, zeigen Abb. 47 und Abb. 48 verschiedene Möglichkeiten der Auswertung.

Differenz des Autophagieflusses zwischen der Inkubation mit DMEM und mit HBSS nach 4 h - LC3B

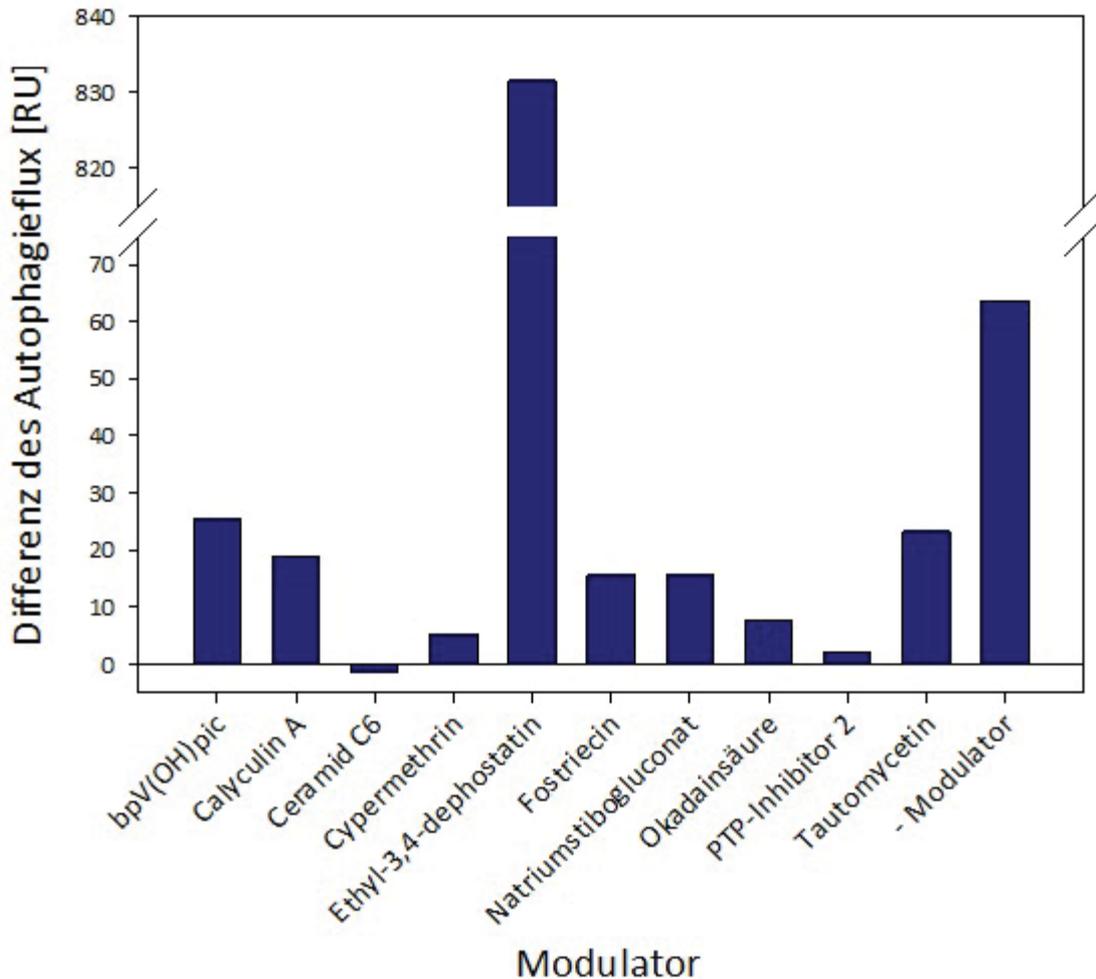


Abb. 47) Differenz des Autophagieflusses zwischen DMEM und HBSS – LC3B. Für die Phosphatasemodulatoren ist die Differenz zwischen dem Autophagiefluss unter Hungerbedingungen und bei Inkubation der Zellen in DMEM dargestellt. Negative Werte drücken daher eine Abnahme aus, positive eine Zunahme.

An Hand von Abb. 47 kann der Anstieg des Autophagieflusses in den Zellen unter Hungerbedingungen im Vergleich zur Inkubation in DMEM festgestellt werden. Das bedeutet, dass hier der Einfluss der Modulatoren auf die Regulation der Autophagie bei Stimulation durch Entzug von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren abgelesen werden kann. Es fällt auf, dass die Stimulation des Autophagieflusses bei Hunger in Anwesenheit aller Modulatoren gegenüber den Bedingungen ohne Modulator erniedrigt ist (Ausnahme ist Ethyl-3,4-dephostatin, was jedoch an den insgesamt erhöhten Werten für diesen Modulator liegt).

Die Inhibitoren der PP2A (Calyculin A, Fostriecin, Okadainsäure) zeigen im Gegensatz zum Aktivator der PP2A (Ceramid C6) alle noch einen Anstieg des Autophagieflusses. Inkubation mit Ceramid C6 führt zu einer Abnahme des Autophagieflusses unter Hungerbedingungen.

Die Inhibitoren der PTP1B und der SHP1/2 (bpV(OH)pic, NaSb-Gluconat) zeigen einen Anstieg des Autophagieflusses in einer Größenordnung, die der des Ergebnisses für die PP2A-

Modulatoren entspricht. Ausnahme ist der PTP-Inhibitor II, der fast zur völligen Inhibition der Autophagiestimulation bei Inkubation mit HBSS führt.

In Abb. 48 ist der prozentuale Anstieg des Autophagieflux unter Hungerbedingungen im Vergleich zur Inkubation mit DMEM dargestellt. Zu beachten ist hier, dass die Werte nichts über die Gesamthöhe des Autophagieflux oder die absoluten Werte der Veränderung aussagen, sondern nur ein Maß für die relative Veränderung bei Hungerbedingungen sind. Der Vorteil dieser Abbildung besteht darin, dass für die Umrechnung in relative Werte der Betrag des Werts für den Autophagieflux eine untergeordnete Rolle spielt. So können betragsmäßig große Werte (Ethyl-3,4-dephostatin) mit kleineren verglichen werden.

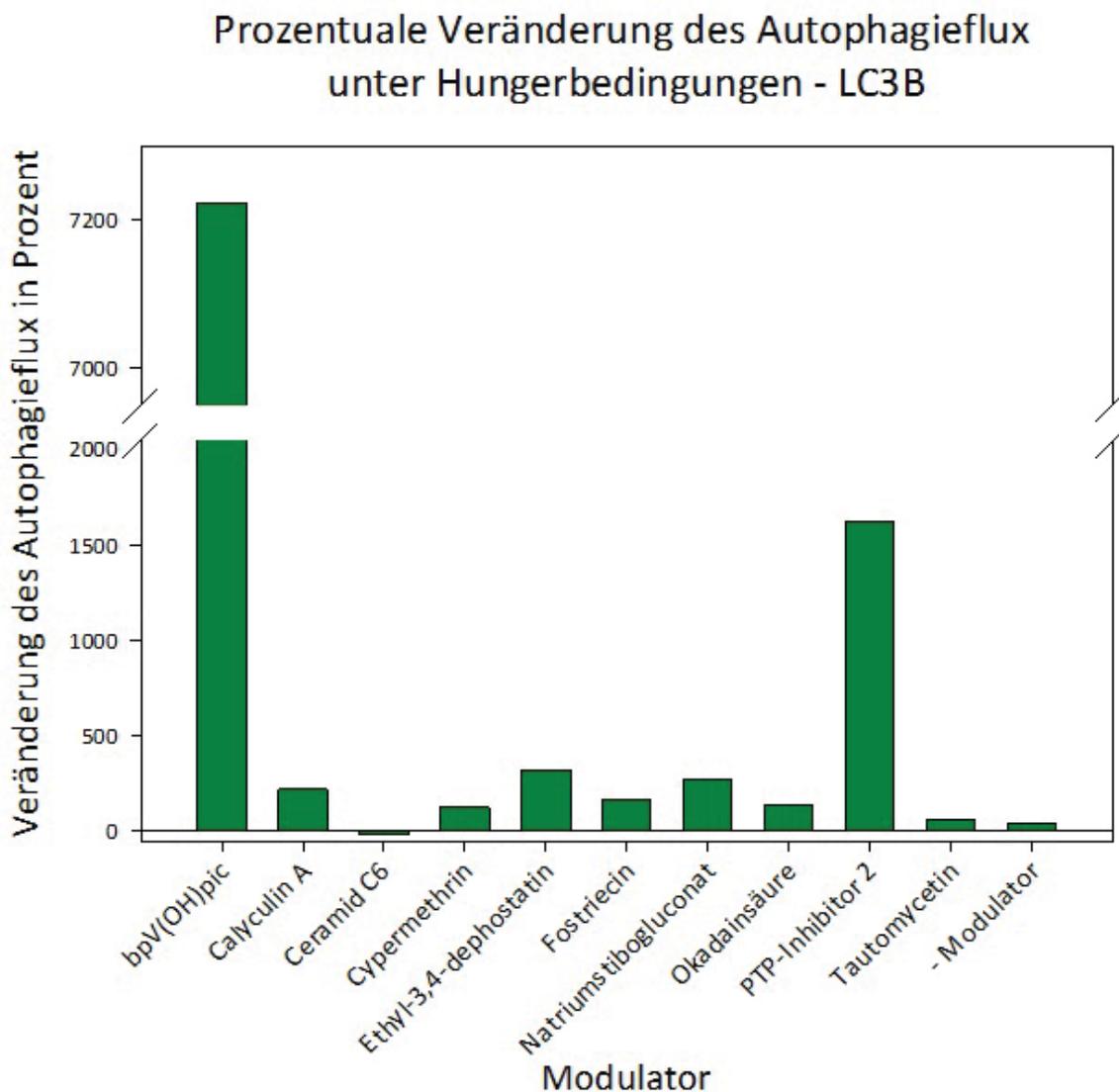


Abb. 48) Relative Veränderung des Autophagieflux unter Hungerbedingungen – LC3B. Der Wert für den Autophagieflux unter Einwirkung der verschiedenen Phosphatasemodulatoren unter Hungerbedingungen in Relation zum Wert des Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM.

Gleichzeitig zeigt sich jedoch auch, dass diese Veränderung automatisch sehr groß wird, wenn der Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM sehr niedrig ist (bei bpV(OH)pic und PTP-Inhibitor II). Die entsprechenden Werte sind also nur unter Vorbehalt zu interpretieren.

Bei den übrigen Werten ist die relative Veränderung gegenüber Inkubation mit DMEM bei den PTP1B-Inhibitoren Ethyl-3,4-dephostatin und NaSB-Gluconat am höchsten. Ebenso zeigt sich auch bei Inkubation mit den PP2A-Inhibitoren (Calyculin A, Fostriecin, Okadainsäure) eine starke relative Veränderung des Autophagieflusses.

3.3.2 Phosphatasemodulator-Experimente - GABARAP

3.3.2.1 Phosphatasemodulator-Experimente - ohne Modulator

Abb. 49 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation ohne Behandlung mit einem Phosphatasemodulator sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 Kaninchen (rb)-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

In Spur 1 und 8 sind die Banden des aufgetragenen Proteinstandards zu sehen. In Spur 9 zeigt sich für rekombinantes GABARAP eine Doppelbande bei ca. 17 kDa. Die übrigen Spuren zeigen jeweils bei 15 kDa und bei 17 kDa eine Bande. Die untere der beiden Banden (bei 15 kDa) stammt von der lipidierten Form des GABARAP, die obere (bei 17 kDa) stammt von der unlipidierten Form des GABARAP. Die Stärke des Signals für lipidiertes GABARAP ist unter Hungerbedingungen bei der Behandlung mit BafA1 auf diesem Western-Blot niedriger als bei der Inkubation mit DMEM. Da das Signal von lipidiertem GABARAP ohne Behandlung mit BafA1 in beiden Medien ähnlich groß ist, ergibt sich eine Verringerung des Autophagieflusses unter Hungerbedingungen in N2A-Zellen. Dieser Versuch wurde mehrmals durchgeführt und die Ergebnisse für den Autophagiefluss gemittelt.

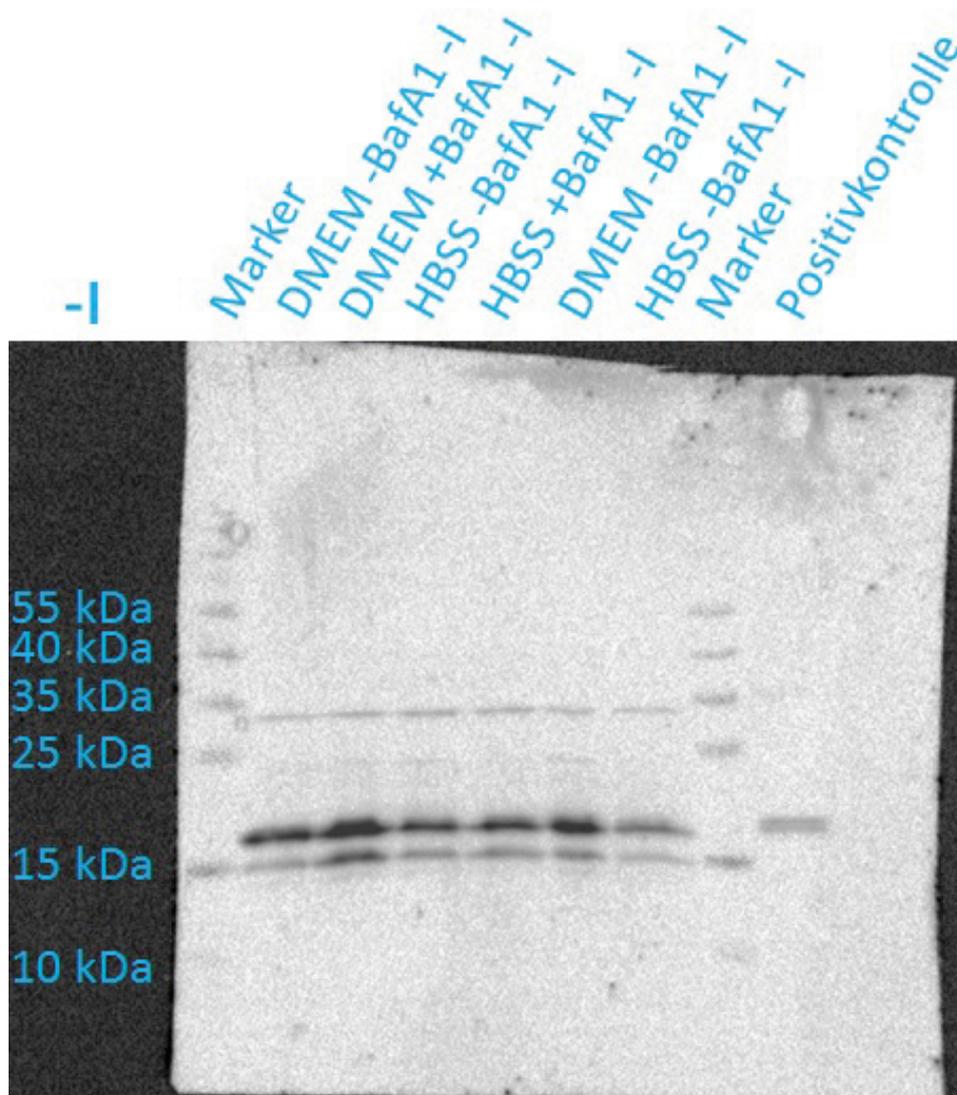


Abb. 49) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen ohne Modulator (-I). Die Marker-Spuren liefern einen Größenstandard (Beschriftung links). Auf Höhe von ca. 17 kDa befindet sich in der Spur der Positivkontrolle eine Bande für GABARAP. In den übrigen Spuren finden sich zwei Banden für die unlipidierte Form (bei 17 kDa) und die lipidierte Form (bei 15 kDa) von GABARAP.

3.3.2.2 Phosphatasemodulator-Experimente - bpV(OH)pic

Abb. 50 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit bpV(OH)pic sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

In den ersten beiden Spuren sind die Banden des Proteinstandards zu sehen. Die letzte Spur zeigt für die Positivkontrolle mit rekombinantem GABARAP eine Doppelbande (bei 17-18 kDa). Auf die übrigen Spuren wurden die Zelllysate der unter verschiedenen Bedingungen inkubierten Zellen aufgetragen. Unter Hungerbedingungen ist ein starker Anstieg der lipidierten Form durch BafA1-Behandlung zu erkennen, der bei der Inkubation mit DMEM nicht auftritt. Der Autophagiefluss unter Hungerbedingungen ist also stark erhöht.

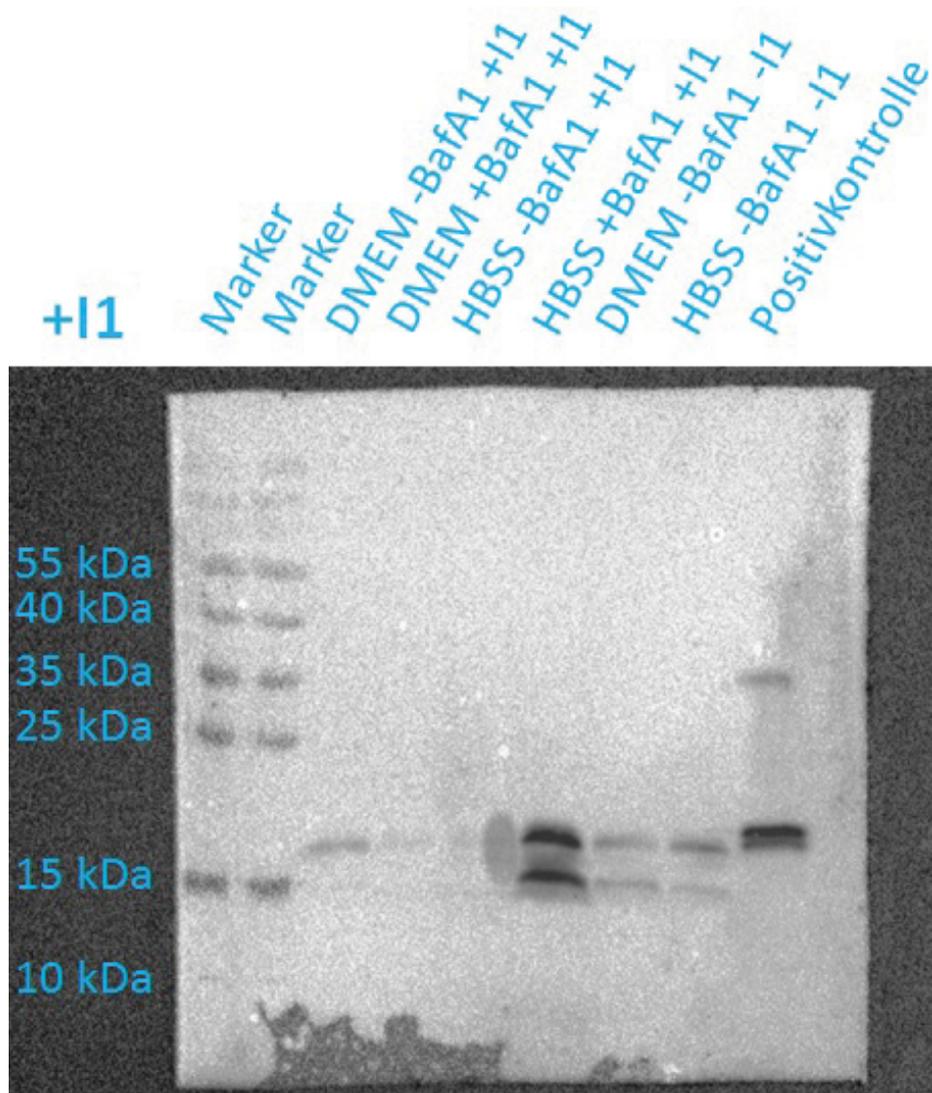


Abb. 50) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit bpV(OH)pic (+I1).

3.3.2.3 Phosphatasemodulator-Experimente - Calyculin A

Abb. 51 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Calyculin A sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die erste und letzte Spur zeigen die Banden des aufgetragenen Proteinstandards. In Spur 8 kann für die aufgetragene Positivkontrolle (rekombinates GABARAP) eine Doppelbande beobachtet werden. Die Banden der lipidierten Form sind in allen übrigen Spuren von niedriger Intensität. Der Autophagiefluss ist unter Hungerbedingungen im Vergleich zur Inkubation mit DMEM leicht erhöht.

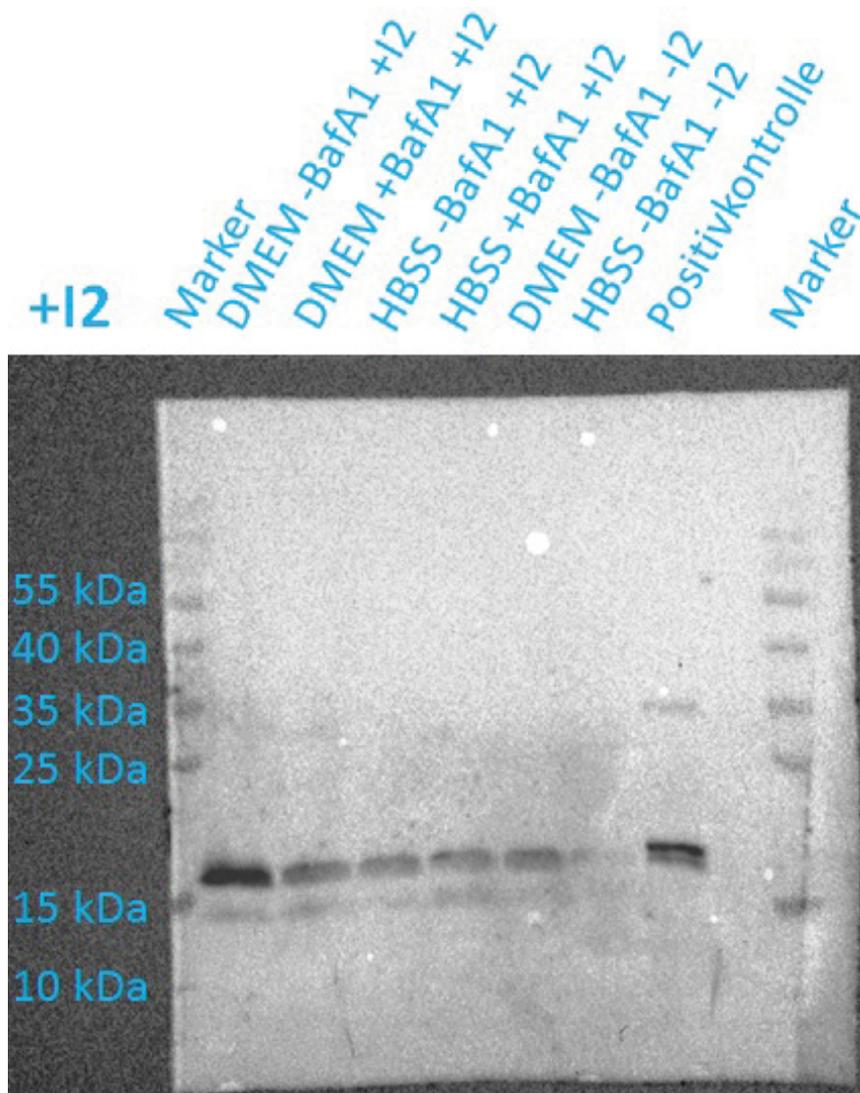


Abb. 51) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Calyculin A (+I2).

3.3.2.4 Phosphatasemodulator-Experimente - Ceramid C6

Abb. 52 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Ceramid C6 sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

In den Spuren 1 und 8 finden sich die Banden des Proteinstandards. Die neunte Spur, auf der die GABARAP-Positivkontrolle aufgetragen wurde, weist eine Doppelbande bei ca. 17 kDa auf. Das Signal der Bande für die lipidierte Form bei Inkubation mit BafA1 unter Hungerbedingungen ist nur mit der ImageLab-Software detektierbar und deutlich niedriger als das entsprechende Signal bei der Inkubation mit DMEM. Der Autophagieefflux unter Hungerbedingungen nimmt im Vergleich zur Inkubation mit DMEM sehr stark ab.

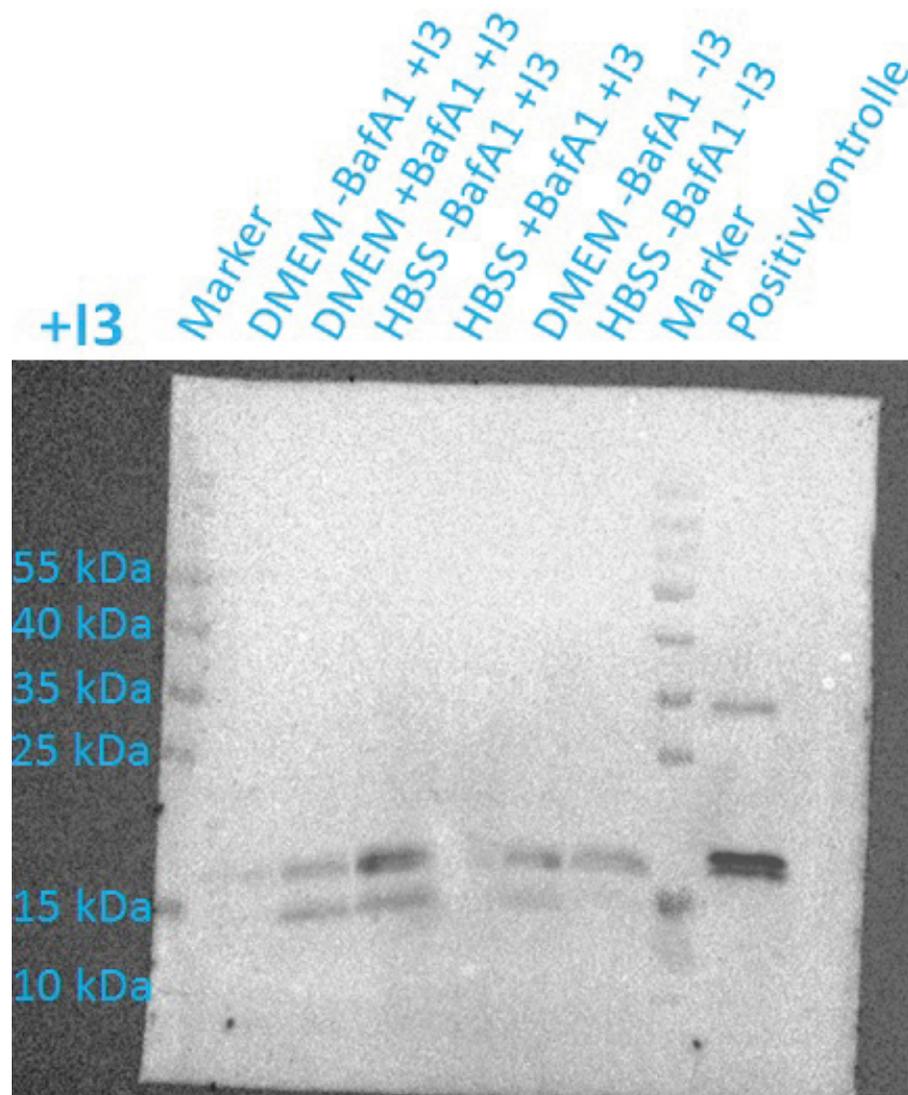


Abb. 52) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ceramid C6 (+I3).

3.3.2.5 Phosphatasemodulator-Experimente - Cypermethrin

Abb. 53 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Cypermethrin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

Auf die erste und dritte Spur wurde der Proteinstandard aufgetragen, dessen Banden hier sichtbar sind. Eine Doppelbande, deren Signal von rekombinantem GABARAP stammt, ist in der letzten Spur sichtbar. Die Banden für lipidiertes GABARAP in den Zelllysaten der Zellen, die mit BafA1 behandelt wurden (Spur 4 und 6), weisen gegenüber den entsprechenden Banden für die Zelllysate der nicht mit BafA1 behandelten Zellen ein jeweils stärkeres Signal auf. Der Autophagieflux ist bei Inkubation mit DMEM ähnlich hoch wie bei Inkubation mit HBSS.

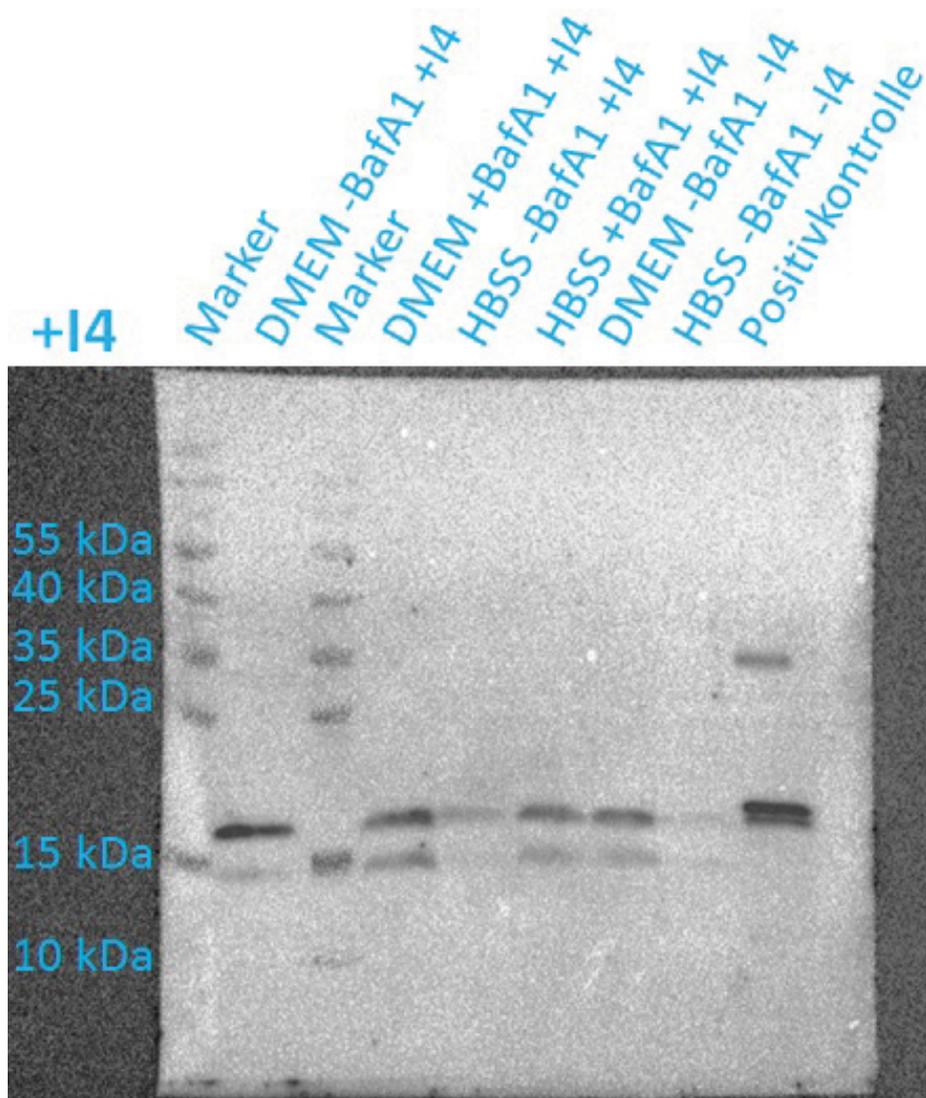


Abb. 53) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Cypermethrin (+I4).

3.3.2.6 Phosphatasemodulator-Experimente - Ethyl-3,4-dephostatin

Abb. 54 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die ersten beiden Spuren zeigen die Banden des aufgetragenen Proteinstandards, die letzte eine Doppelbande sehr niedriger Intensität für rekombinantes GABARAP (Positivkontrolle). Der Grund hierfür könnte ein Problem bei der Behandlung der PVDF-Membran mit den Antikörpern sein (siehe Kapitel 3.3.1.6). Daraus ergeben sich im Vergleich zu den Werten für die übrigen Modulatoren Werte für den Autophagiefluss, die in einer höheren Größenordnung liegen.

Die Bande für lipidiertes GABARAP ist unter Hungerbedingungen in Abwesenheit von BafA1 schwächer als die Banden von lipidiertem GABARAP in den übrigen Spuren. Die Differenz der Banden der lipidierten Form ist unter Hungerbedingungen größer als bei Inkubation der Zellen in DMEM.

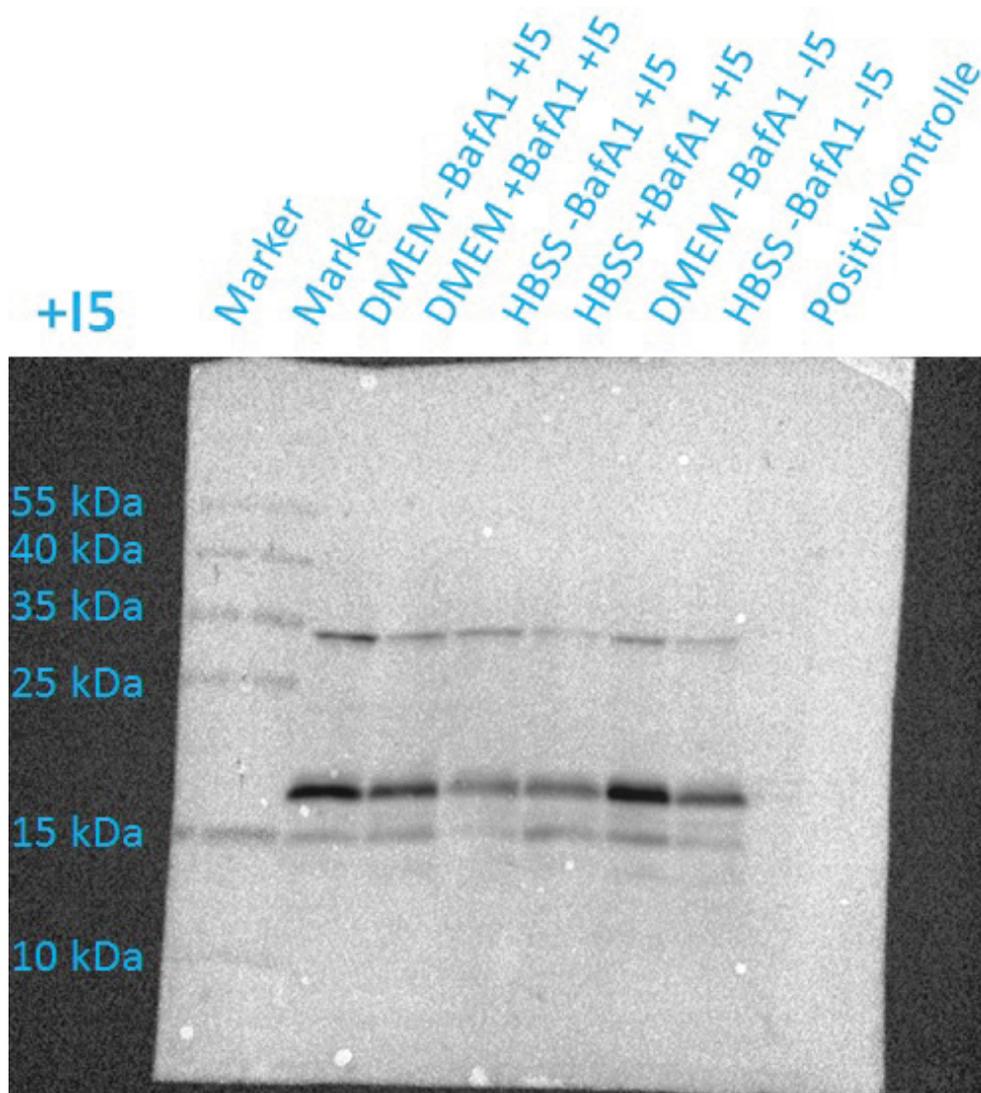


Abb. 54) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Ethyl-3,4-dephostatin (+I5).

3.3.2.7 Phosphatasemodulator-Experimente - Fostriecin

Abb. 55 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Fostriecin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

In der ersten und letzten Spur sieht man die Signale des Proteinstandards, in der achten Spur die von rekombinantem GABARAP der Positivkontrolle hervorgerufene Doppelbande. Die Differenz der Banden für die lipidierte Form von GABARAP in den Spuren, auf die die Zelllysate der Zellen aufgetragen wurden, die mit HBSS inkubiert wurden, ist größer als die Differenz bei Inkubation mit DMEM. Der Autophagiefluss unter Hungerbedingungen ist also erhöht.

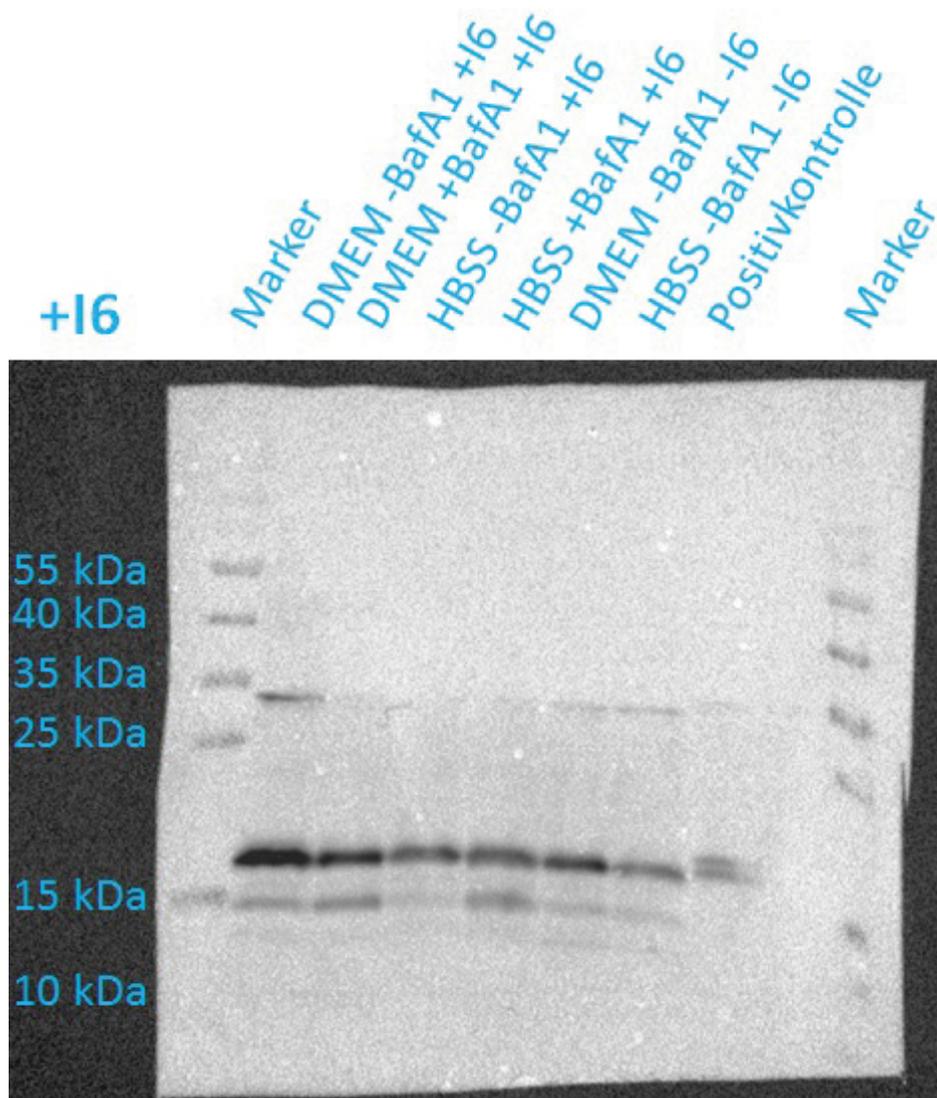


Abb. 55) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Fostriecin (+16).

3.3.2.8 Phosphatasemodulator-Experimente - NaSb-Gluconat

Abb. 56 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit NaSb-Gluconat sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

In der ersten und achten Spur zeigen sich die Banden des aufgetragenen Proteinstandards. In der letzten Spur, auf die die Positivkontrolle aufgetragen wurde, ist eine Doppelbande für GABARAP erkennbar. Die übrigen Spuren, auf die die Zelllysate der unter unterschiedlichen Bedingungen kultivierten Zellen aufgetragen wurden, weisen jeweils zwei Banden für GABARAP auf. Dabei sind die Banden in den Spuren 4 bis 7 sehr „wellig“ (Erklärung siehe Kapitel 3.3.1.8). Die Banden ähneln denen des Western-Blots gegen LC3B sehr. Da die Membran nacheinander (mit zwischenzeitlichem Stripping) mit dem GABARAP und dann mit dem LC3B-Antikörper behandelt wurde, liegt der Verdacht nahe, dass die Signale einander überlagern bzw. das Signal eines Western-Blots die durch Stripping „abgeschwächte Version“ des vorhergegangenen Western-Blots sein könnte. Allerdings findet sich auf dem

Western-Blot, der mit LC3B-behandelt wurde, nach der Detektion kein Restsignal z.B. von der GABARAP-Positivkontrolle oder den unspezifischen Banden, die hier bei etwa 32 kDa vorliegen (siehe Abb. 41). Deren Signal ist teilweise stärker als das der GABARAP-Banden und wird dennoch vom LC3B-Antikörper nicht detektiert.

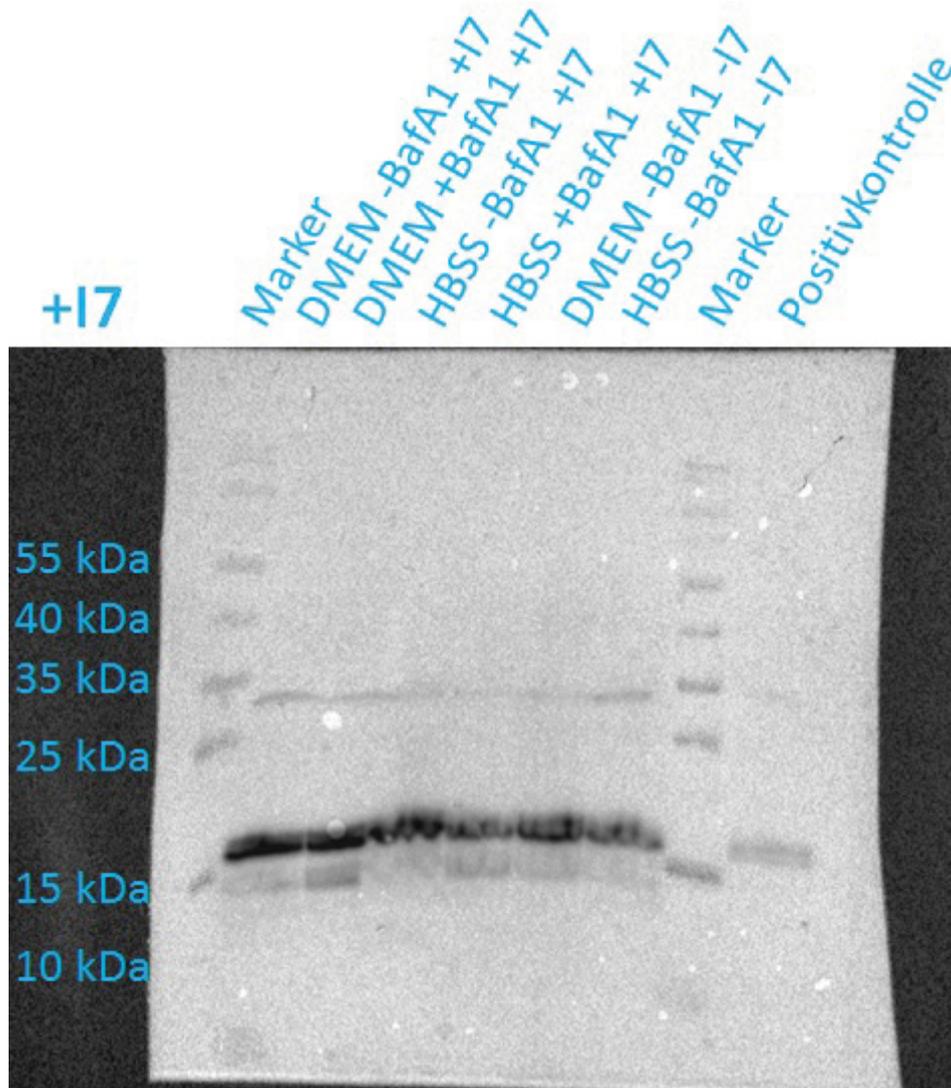


Abb. 56) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit NaSb-Gluconat (+I7).

Ebenso bindet auch der rb-anti-GABARAP-Antikörper spezifisch an GABARAP und nicht an LC3B, da ansonsten auf Abb. 56 eine Bande für die LC3B-Positivkontrolle sichtbar wäre. Außerdem stammen die Erstantikörper jeweils aus einem anderen Organismus (ms-anti-LC3B und rb-anti-GABARAP), so dass auch deswegen keine Wechselwirkungen auftreten sollten. Die Banden in beiden Western-Blots sollten also tatsächlich vom jeweiligen Atg8-Homolog stammen und keine Überlagerungen oder „Reste“ voneinander sein.

Die Bande der lipidierten Form von GABARAP liefert sowohl unter Hungerbedingungen als auch bei Inkubation mit DMEM ein stärkeres Signal, wenn die Zellen mit BafA1 inkubiert wurden. Bei Inkubation ohne BafA1 ist die untere Bande jeweils schwächer.

3.3.2.9 Phosphatasemodulator-Experimente - Okadainsäure

Abb. 57 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Okadainsäure sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

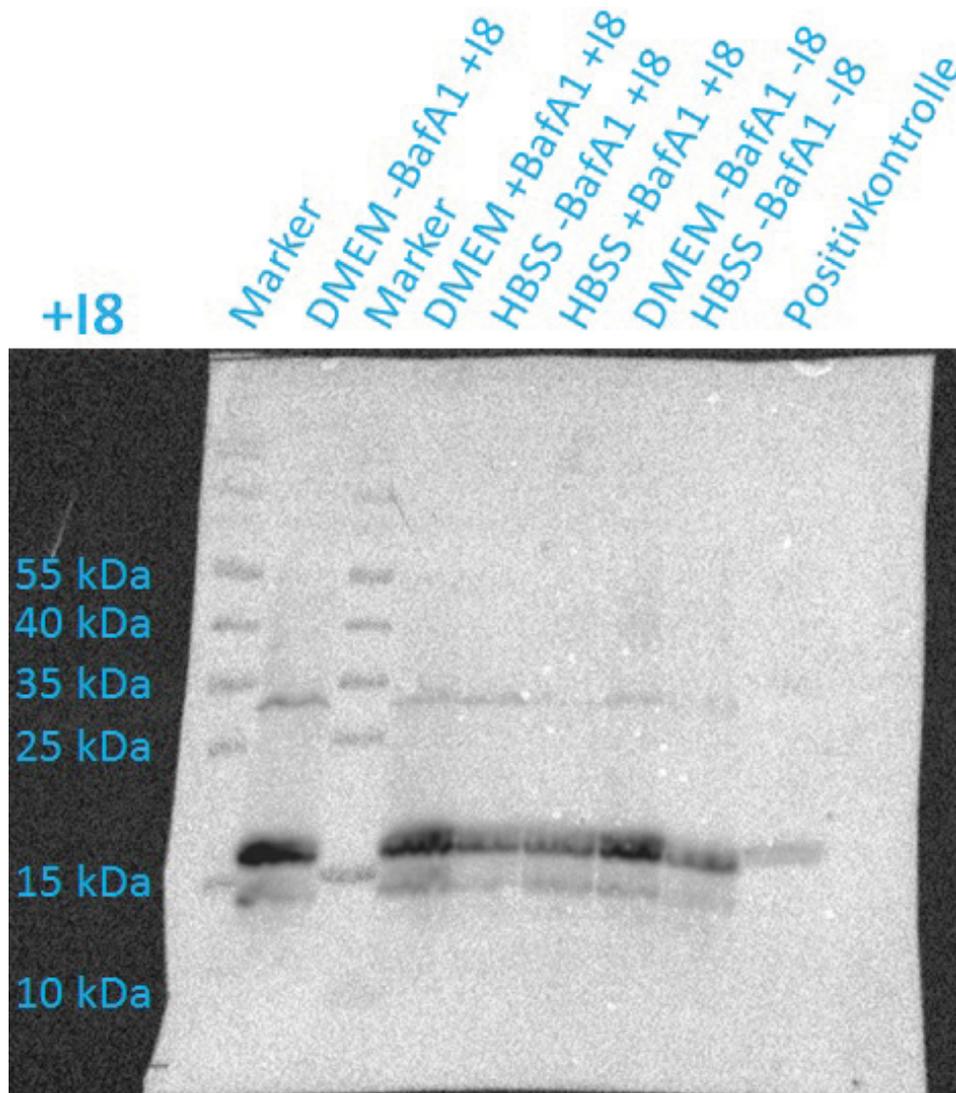


Abb. 57) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Okadainsäure (+I8).

Auf Spur 1 und 3 wurde der Proteinstandard als interne Größenreferenz aufgetragen. In der letzten Spur sieht man eine Doppelbande für die Positivkontrolle mit rekombinantem GABARAP. Die Spuren mit den Zelllysaten weisen jeweils zwei Banden für die beiden GABARAP-Formen auf. Die Differenz der Signale der Banden von lipidisiertem GABARAP der in DMEM kultivierten Zellen (Spur 2 und 4) ist geringer als die der Banden für lipidisiertes GABARAP von unter Hungerbedingungen kultivierten Zellen. Es ist also zu einer Erhöhung des Autophagieflux unter Hungerbedingungen gekommen.

Erneut sind die Banden „wellig“. Ebenso gleichen sie den Banden auf dem zugehörigen LC3B-Western-Blot (Kapitel 3.3.1.9). Aus den im vorigen Kapitel (Kapitel 3.3.2.8) erläuterten Gründen sollte dies allerdings kein Problem sein.

3.3.2.10 Phosphatasemodulator-Experimente - PTP-Inhibitor II

Abb. 58 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit PTP-Inhibitor II sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

Die dunklere Färbung von etwa zwei Dritteln der in Abb. 58 gezeigten Membran im unteren und rechten Bereich resultiert aus Flüssigkeit, die bei der Detektion unter die Membran geraten ist und sich dort verteilt hat. Auf die Auswertung des Western-Blots nimmt dies jedoch keinen Einfluss.

Die ersten beiden Spuren zeigen die Banden des Proteinstandards, die letzte Spur die Positivkontrolle mit rekombinantem GABARAP. Bei den auf Spur 4 und 6 aufgetragenen Zelllysaten sieht man, dass die Bande für lipidertes GABARAP jeweils stärker ist als in den Spuren 3 und 5. Dies liegt an der Zugabe von BafA1, mit dem die Zellen inkubiert wurden, aus denen diese Zelllysate stammen. Ein Unterschied zwischen der Differenz der Banden für lipidertes GABARAP unter Hungerbedingungen und bei Inkubation mit DMEM lässt sich mit bloßem Auge kaum feststellen.

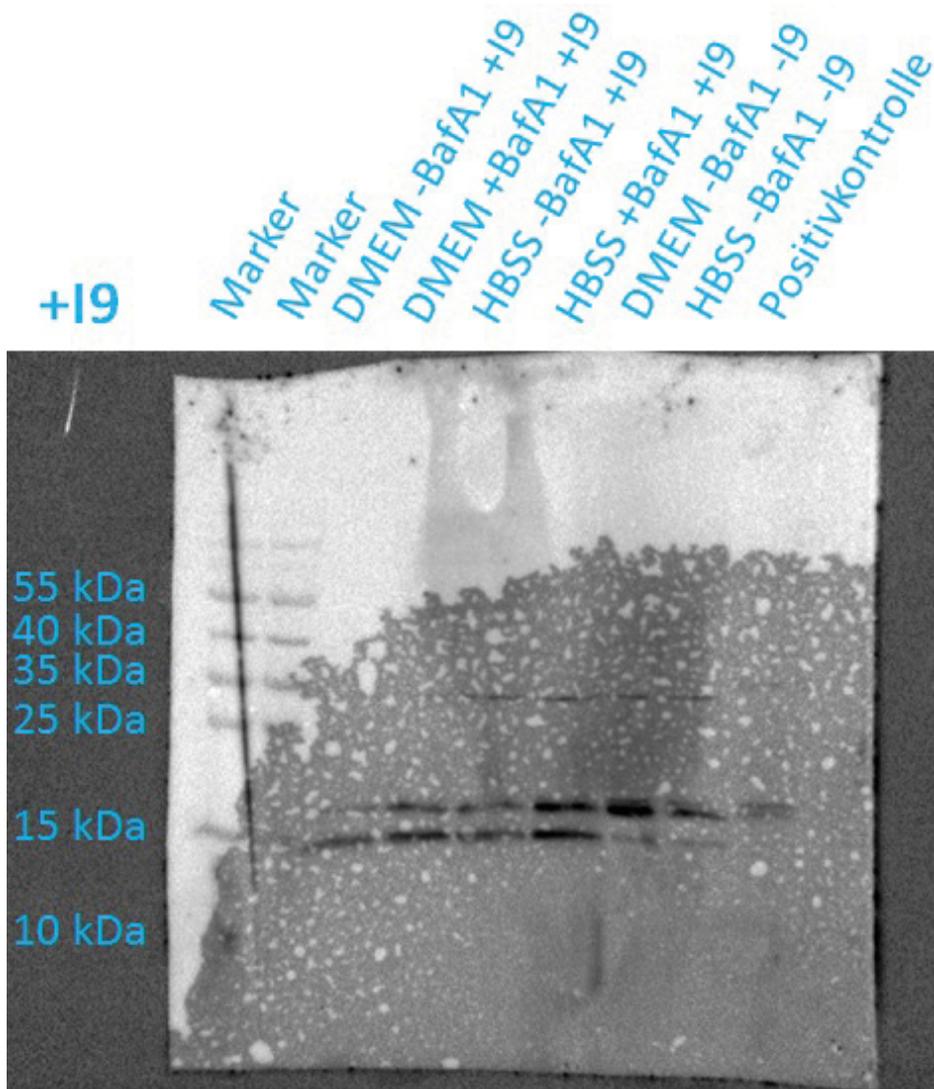


Abb. 58) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit PTP-Inhibitor II (+I9).

3.3.2.11 Phosphatasemodulator-Experimente - Tautomycetin

Abb. 59 zeigt den Western-Blot, der die Banden zeigt, die durch SDS-PAGE und Western-Blotting der Zelllysate nach 4 h Inkubation mit Tautomycetin sowie AK-Behandlung (Primär-AK: 1:1000 rb-anti-GABARAP in TBST, Sekundär-AK: 1:10000 Ziege-anti-rb in TBST) der Membran sichtbar werden.

In der ersten und letzten Spur wurde der Proteinstandard aufgetragen, dessen Banden dort jeweils zu sehen sind. In der achten Spur zeigt sich eine Doppelbande für rekombinantes GABARAP der Positivkontrolle. Die Spuren, auf die die Zelllysate der unter verschiedenen Bedingungen inkubierten Zellen aufgetragen sind, weisen jeweils zwei Banden auf, die von lipidierterm und unlipidierterm GABARAP stammen. Die Bande für lipidierterm GABARAP aus dem Zelllysate der unter Hungerbedingungen mit BafA1 inkubierten Zellen (Spur 5) ist etwas schwächer als die entsprechende Bande der Zellen, die in DMEM + BafA1 kultiviert wurden (Spur 3). Die Differenz der Banden der lipidierterm Form von GABARAP ist unter Hungerbedingungen niedriger als bei Inkubation mit DMEM.

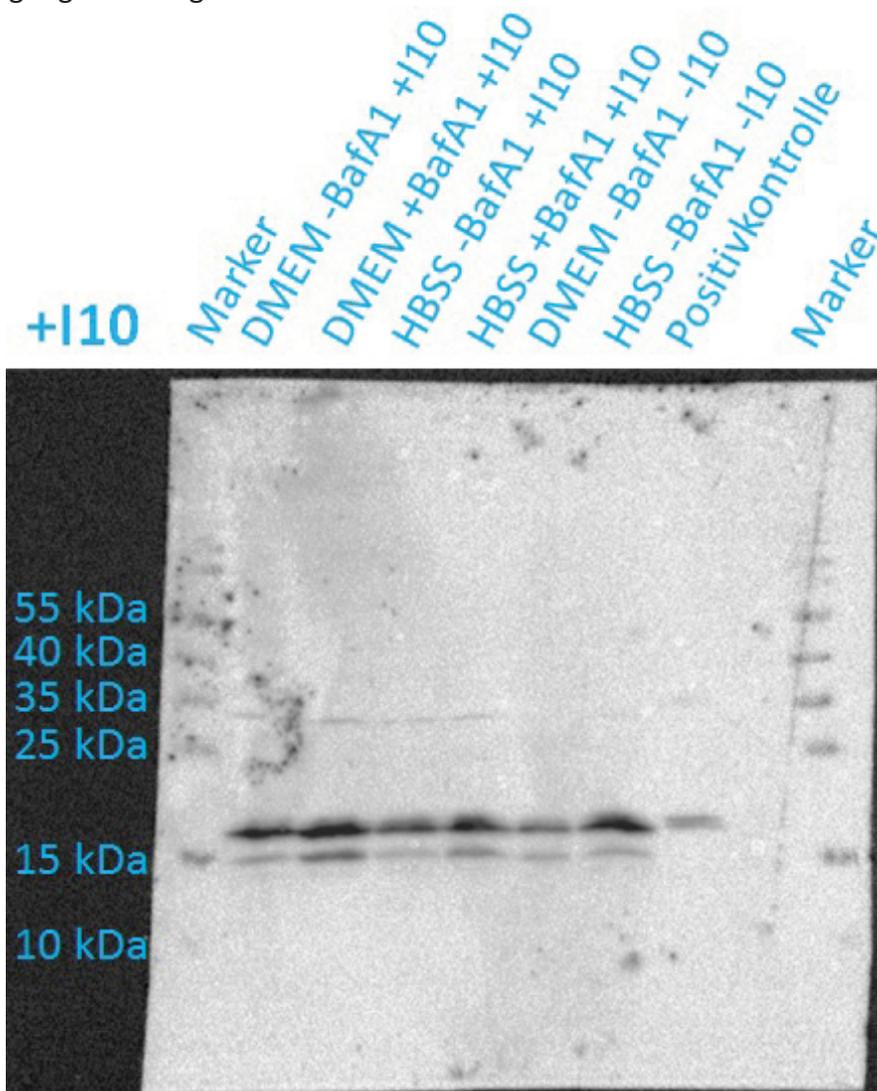


Abb. 59) Western-Blot von GABARAP nach 4 h Inkubation von N2A-Zellen mit Tautomycetin (+I10).

3.3.2.12 Zusammenfassung der Phosphatasemodulator-Experimente - GABARAP

Wie im entsprechenden Kapitel für LC3B sollen an dieser Stelle die Ergebnisse der Western-Blots in einer Übersicht (Abb. 60) dargestellt werden.

Auch hier können dadurch Unterschiede, die sich durch die Behandlung mit den Phosphatasemodulatoren ergeben, auf einen Blick dargestellt werden.

So fällt hier z.B. der Unterschied im Bandenmuster für Calyculin A (+ I2) gegenüber Tautomycetin (+ I10) auf.

Um die unterschiedlichen Auswirkungen auf den Autophagiefluss anschaulicher darzustellen, wurde auch hier die Intensität der Banden (auf jedem Western-Blot in Relation zur Positivkontrolle) quantifiziert und die Differenz der Banden für die lipidierte Form von GABARAP (der Autophagiefluss) in Anwesenheit der unterschiedlichen Phosphatasemodulatoren bei Inkubation mit DMEM der mit HBSS gegenübergestellt. Abb. 61 gibt diese Werte an.

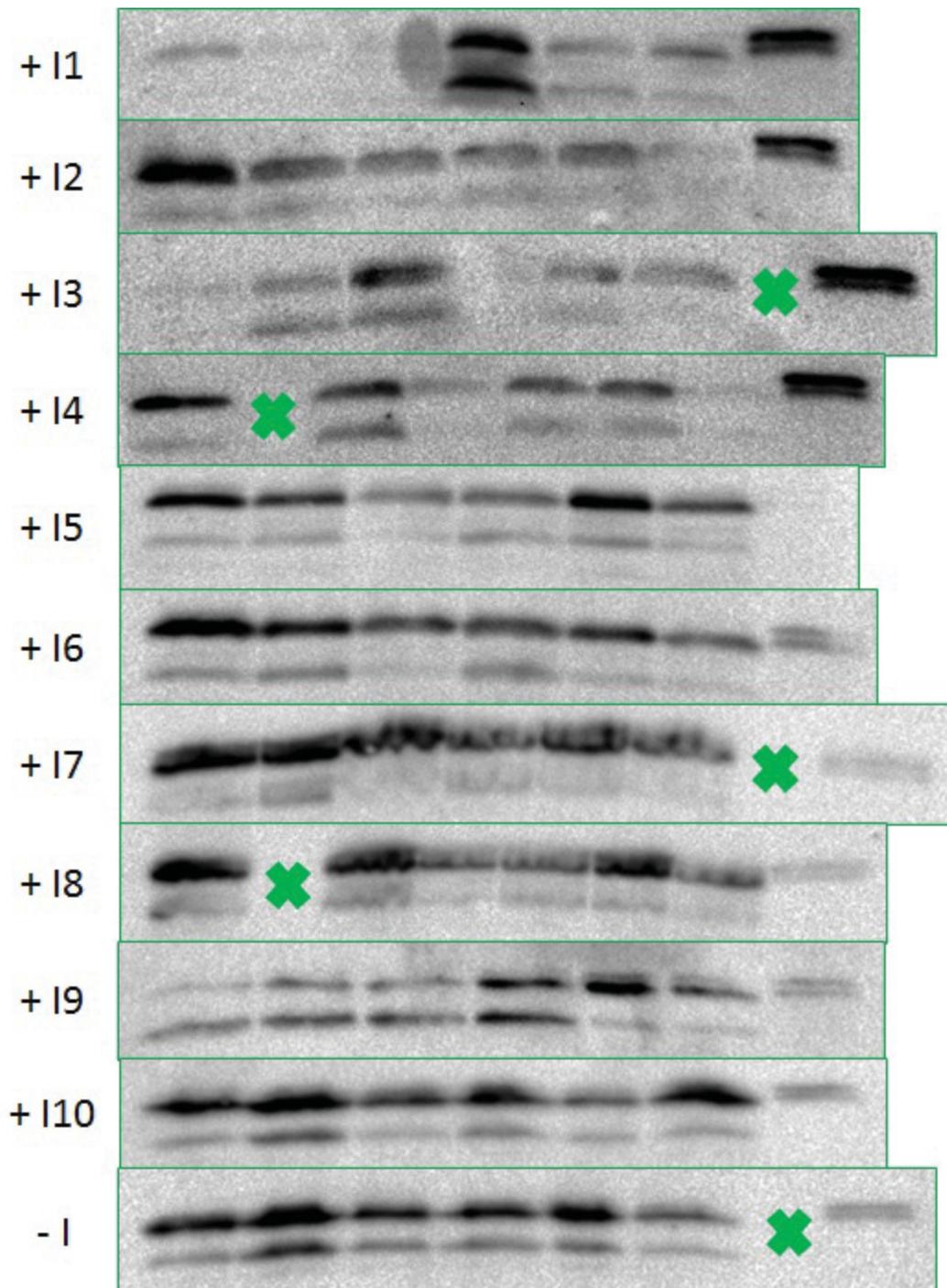


Abb. 60) Die Ergebnisse der Western-Blots für GABARAP mit den verschiedenen Phosphatasemodulatoren auf einen Blick. Die Phosphatasemodulatoren sind von I1 bis I10 in alphabetischer Reihenfolge durchnummeriert. Die Nummer entspricht derjenigen auf den in den vorangegangenen Kapiteln gezeigten Western-Blots. - I entspricht der Behandlung der Zellen ohne Phosphatasemodulator. Die grünen Kreuze bedeuten, dass diese Spur leer gelassen wurde oder eine Spur war, auf der der Proteinstandard aufgetragen wurde.

Autophagieflux in Anwesenheit von verschiedenen Phosphatasemodulatoren - GABARAP

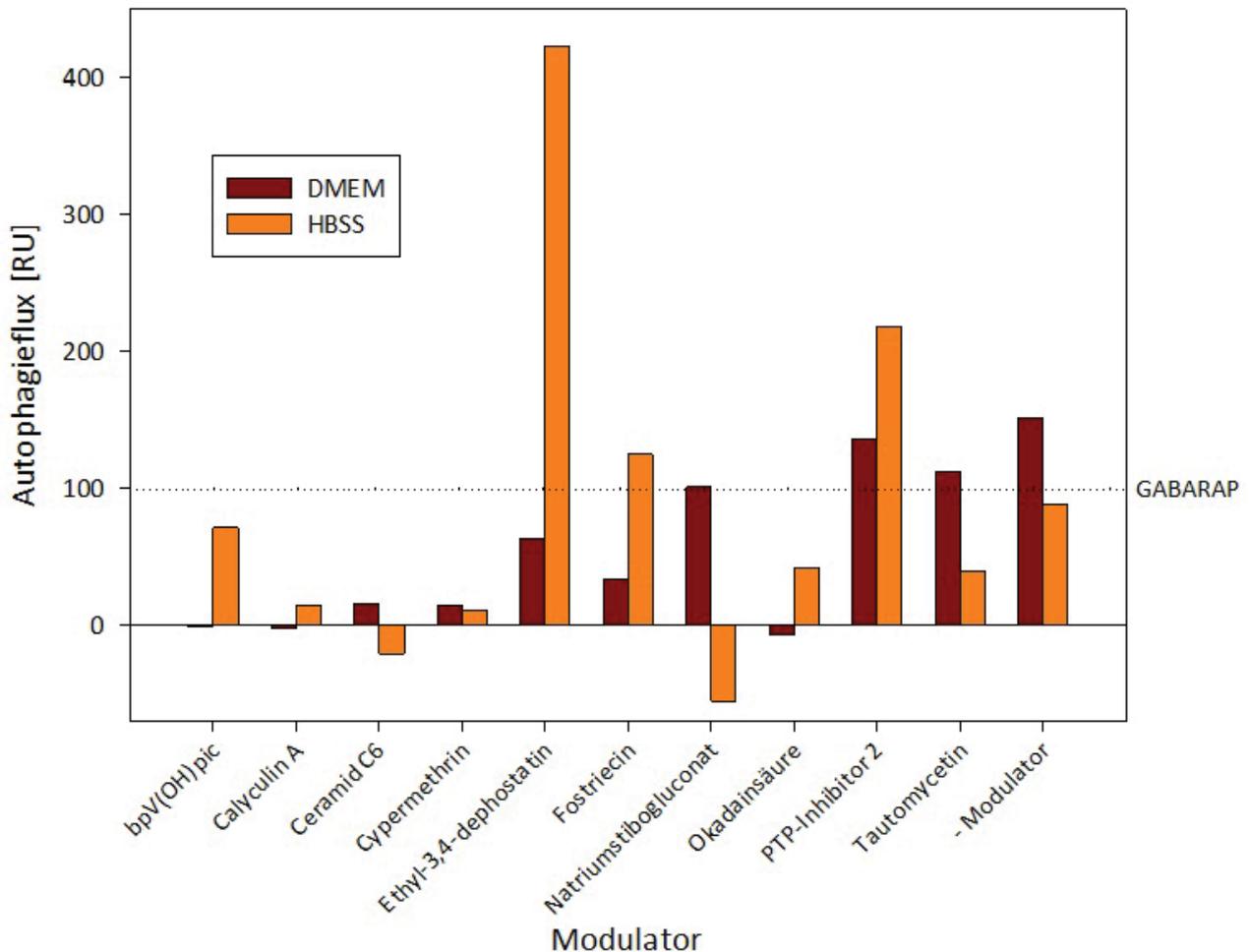


Abb. 61) Quantifizierung des Autophagieflux in Anwesenheit der verschiedenen Phosphatasemodulatoren - GABARAP. Die Differenz der Intensitäten der Banden (Autophagieflux) bei Inkubation der Zellen mit DMEM (rot) und mit HBSS (orange) werden verglichen. Die Signalstärke der GABARAP-Doppelbande der Positivkontrolle, die jeweils als Referenz für die Intensität herangezogen wurde, wird mit 100 angegeben.

Unter Hungerbedingungen kommt es bei Anwesenheit der Phosphatasemodulatoren bpV(OH)pic, Calyculin A, Ethyl-3,4-dephostatin, Fostriecin, Okadainsäure und PTP-Inhibitor II zu einer Aktivierung des Autophagieflux im Vergleich zur Inkubation mit DMEM. Die übrigen Modulatoren zeigen dagegen eine Abnahme. Bei Ceramid C6 und NaSb-Gluconat führt das sogar dazu, dass der Autophagieflux so stark inhibiert wird, dass er einen negativen Wert annimmt.

Interessant ist, dass der Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM von bpV(OH)pic, Calyculin A und Okadainsäure so weit herunterreguliert wird, dass es nicht mehr zu einem beobachtbaren Flux kommt. Aber die Stimulation des Autophagieflux durch Hungerbedingungen diese Inhibition zumindest teilweise rückgängig machen zu können scheint.

Im Vergleich zu Abb. 46, der entsprechenden Abbildung für LC3B, zeigen sich für die Modulatoren teilweise starke Unterschiede. Während es in Anwesenheit von Tautomycetin

unter Hungerbedingungen zu einer Zunahme des Autophagieflusses gemessen an LC3B kommt, nimmt dieser ab, wenn GABARAP als Maßstab für den Autophagiefluss herangezogen wird.

Auch hier wurde die Differenz im Autophagiefluss zwischen Hungerbedingungen und Inkubation mit DMEM berechnet, was in Abb. 62 dargestellt ist.

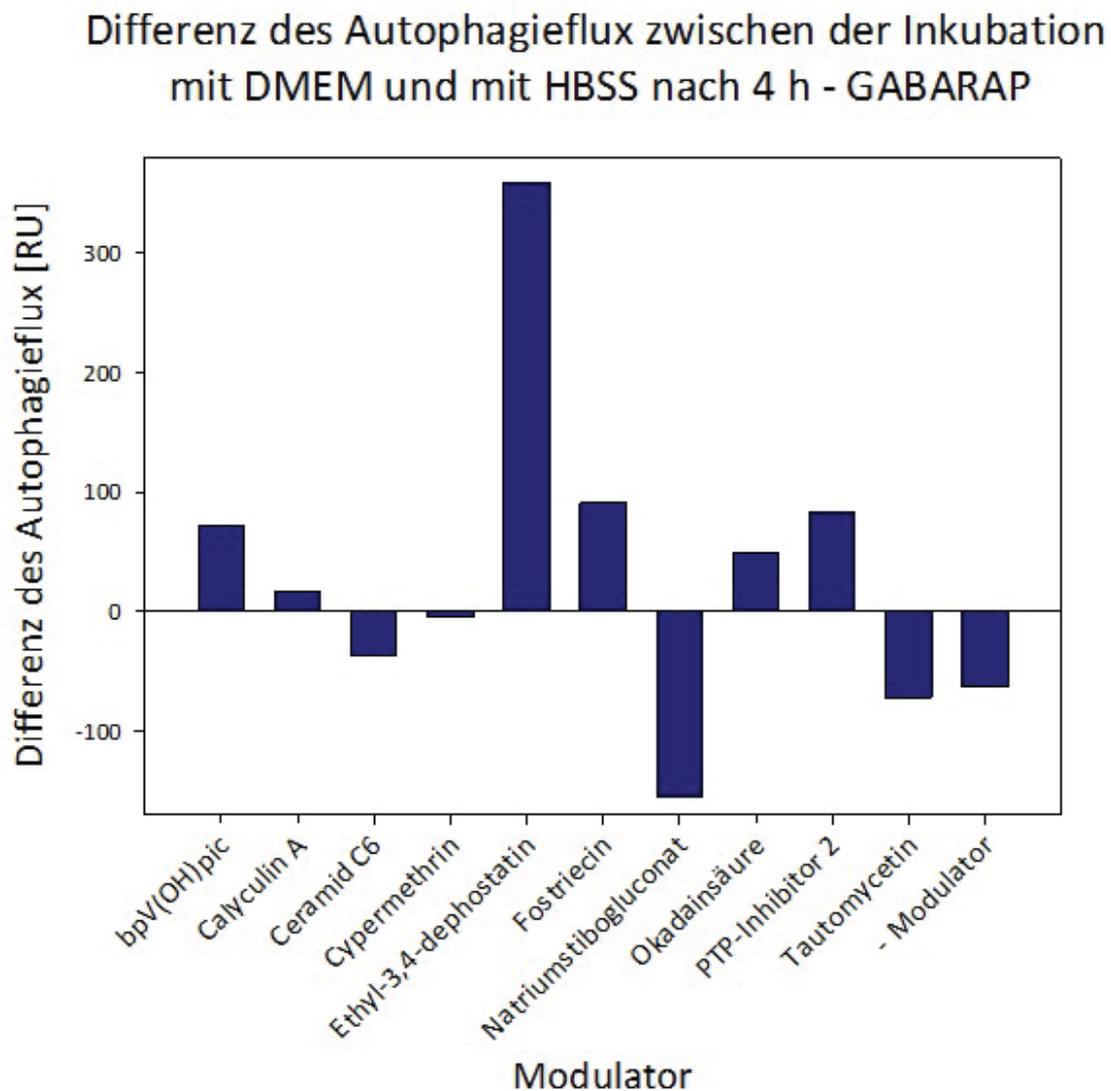


Abb. 62) Differenz des Autophagieflusses zwischen DMEM und HBSS - GABARAP. Für die Phosphatasemodulatoren ist die Differenz zwischen dem Autophagiefluss unter Hungerbedingungen und bei Inkubation der Zellen in DMEM dargestellt. Negative Werte drücken daher eine Abnahme aus, positive eine Zunahme.

Die PP2A-Inhibitoren Calyculin A, Fostriecin und Okadainsäure weisen ebenso positive Werte auf, also eine Zunahme des Autophagieflusses unter Hungerbedingungen, wie die PTP-Inhibitoren, bpV(OH)pic, Ethyl-3,4-dephostatin und PTP-Inhibitor II. Bei Inkubation mit den übrigen Modulatoren kommt es zu einer Abnahme des Autophagieflusses bei Hungerbedingungen.

Bezogen auf den Kontrollversuch ohne Modulator kommt es unter Hungerbedingungen im Vergleich zur Inkubation mit DMEM bei den meisten Modulatoren zu einer geringeren Abnahme oder sogar einer Zunahme.

Der Wert für Ethyl-3,4-dephostatin ist auch hier im Vergleich zu den übrigen Werten hoch, da die Ausgangswerte für die Signalstärke bereits viel höher waren.

Für den Autophagiefluss an Hand von GABARAP wurde ebenfalls ein Diagramm erstellt, das den relativen Anstieg des Autophagieflux darstellt (Abb. 63). Auch hier gilt, dass die durch Höhe des relativen Anstiegs keine Aussagen über die absolute Größe des Autophagieflux gemacht werden können.

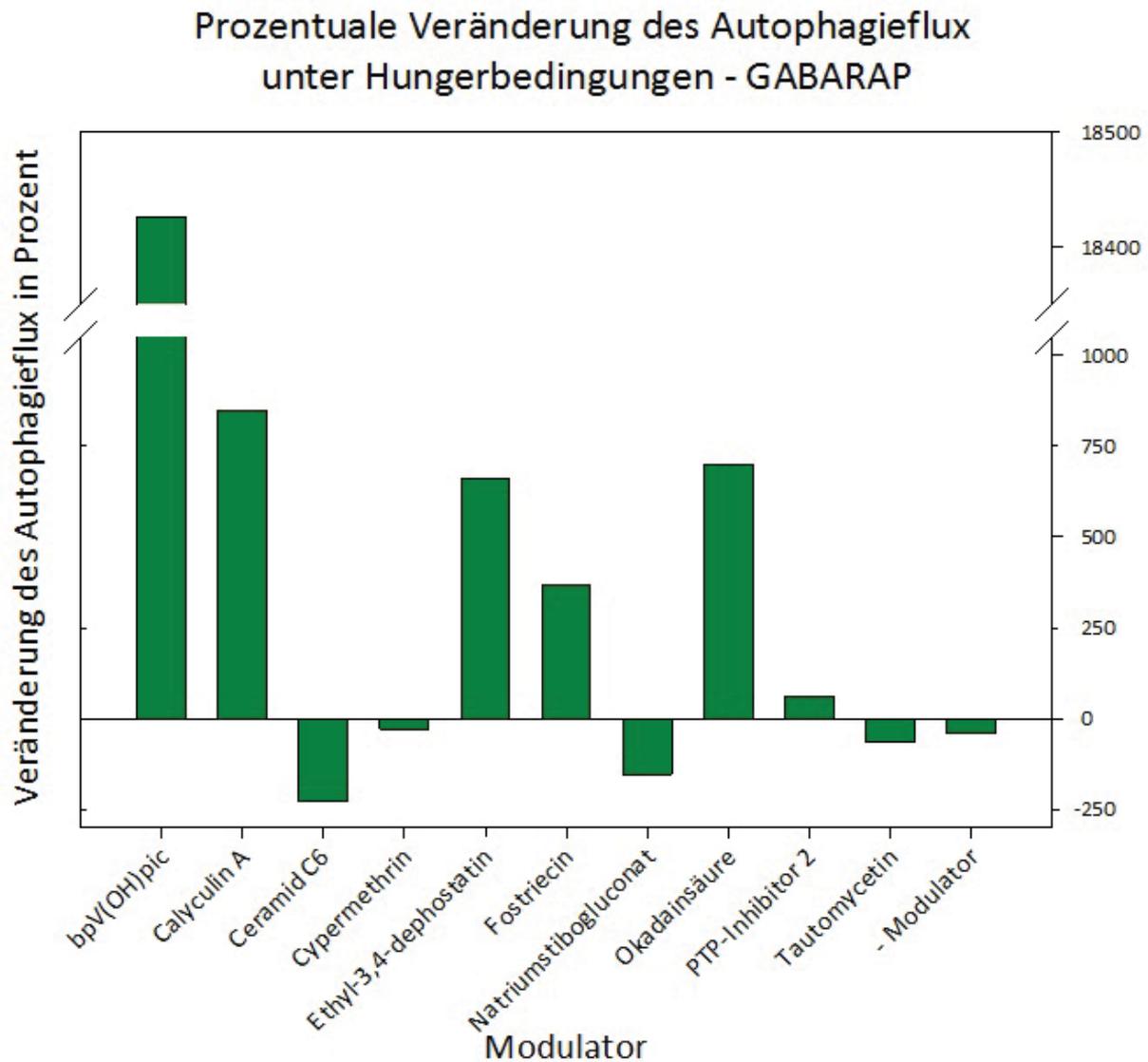


Abb. 63) Relative Veränderung des Autophagieflux unter Hungerbedingungen - GABARAP. Der Wert für den Autophagieflux unter Einwirkung der verschiedenen Phosphatasemodulatoren unter Hungerbedingungen in Relation zum Wert des Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM.

Wegen der sehr kleinen Werte für den Autophagieflux bei Inkubation mit DMEM ist der Wert der relativen Veränderung für bpV(OH)pic nur mit Vorsicht zu interpretieren.

Es fällt auf, dass die PP2A-Inhibitoren Calyculin A und Okadainsäure eine ähnliche relative Veränderung des Autophagieflux bewirken. Fostriecin, der andere PP2A-Inhibitor erhöht den Autophagieflux nur halb so stark. Der Aktivator von PP2A, Ceramid C6, führt zu einer starken Reduktion des Flux.

Von den PTP1B-Inhibitoren erhöht nur Ethyl-3,4-dephostatatin den Autophagiefluss (bpV(OH)pic unter Vorbehalt), die übrigen führen zu einer Reduktion des Flux, insbesondere NaSb-Gluconat.

3.4 Versuche mit RNSi

Um zusätzliche Gewissheit über die exakten Funktionen der Phosphatasen in der Autophagieregulation zu erhalten, sollten die N2A-Zellen mit spezifisch gegen die Phosphatasen wirkenden siRNS' transient transfiziert werden.

Um die Transfektionseffizienz zu testen, wurden die Zellen zuerst mit einer unspezifischen Fluoreszenz-markierten siRNS (allStar negative siRNS AlexaFluor (AF488)) transfiziert und unter dem LSM betrachtet.

In Abb. 64 ist eine Aufnahme 24 h nach Transfektion zu sehen.

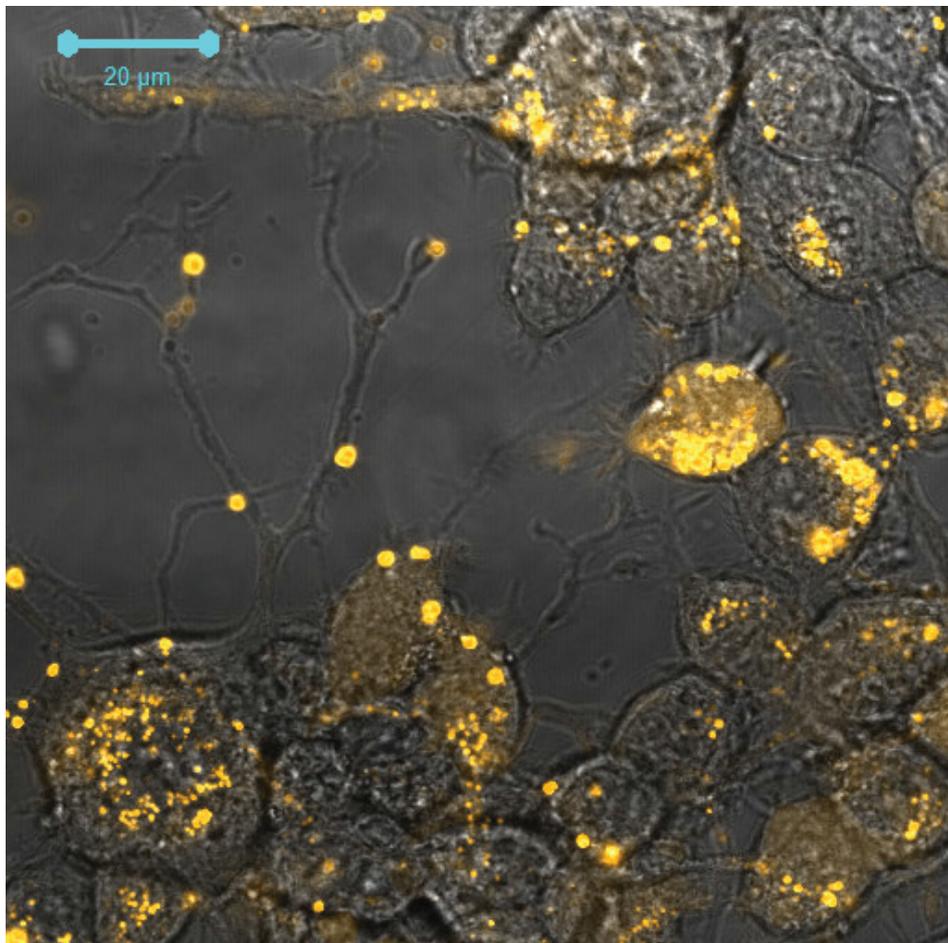


Abb. 64) N2A-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNS AF488. Aufgenommen mit 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv, 5% Laser-Verstärkung, 488 nm-Argon-Laser. Die fluoreszenzmarkierte siRNS (orange, falschfarben) ist innerhalb der Zellen in punktförmigen Strukturen lokalisiert. In manchen Zellen kommt es auch zu einer gleichmäßigen Lokalisation der siRNS im Zytoplasma.

In der Aufnahme sind in den meisten Zellen orangefarbene (falschfarben) Punkte zu erkennen (z.B. Zelle unten links). Einige Zellen sind gleichmäßig orange gefärbt, wobei diese Färbung etwas schwächer ist und zusätzlich auch orangefarbene Punkte höherer Intensität

innerhalb der Zelle auftreten (z.B. Zelle rechts in der Mitte). Die Orangefärbung resultiert aus der Fluoreszenzmarkierung der siRNS mit AF488, welches vom Laserlicht angeregt wird und daher fluoresziert. Bis zum Zeitpunkt von 120 h nach Transfektion wurden alle 24 h Aufnahmen von den Zellen gemacht. In allen Aufnahmen war das Ergebnis dem von 24 h ähnlich. Auch in anderen z-Ebenen war kein anderes Ergebnis sichtbar.

Da Versuche zur Transfektion von N2A-Zellen vom Hersteller des Transfektionsreagens' (DharmaFect1) nicht erwähnt werden, ist an dieser Stelle nicht klar, ob dieses Muster den Erwartungen entspricht. Daher wurden weitere Transfektionen mit AllStars negative siRNS AF488 an Zelllinien durchgeführt, die der Hersteller als zur Transfektion geeignet aufführt (HEK293 und HeLa) und an einer weiteren Zelllinie, die vom Hersteller nicht verzeichnet ist (Hep G2). Die Ergebnisse dieser Transfektionen (jeweils 24 h nach Transfektion) sind in Abb. 65 bis 67 zu sehen.

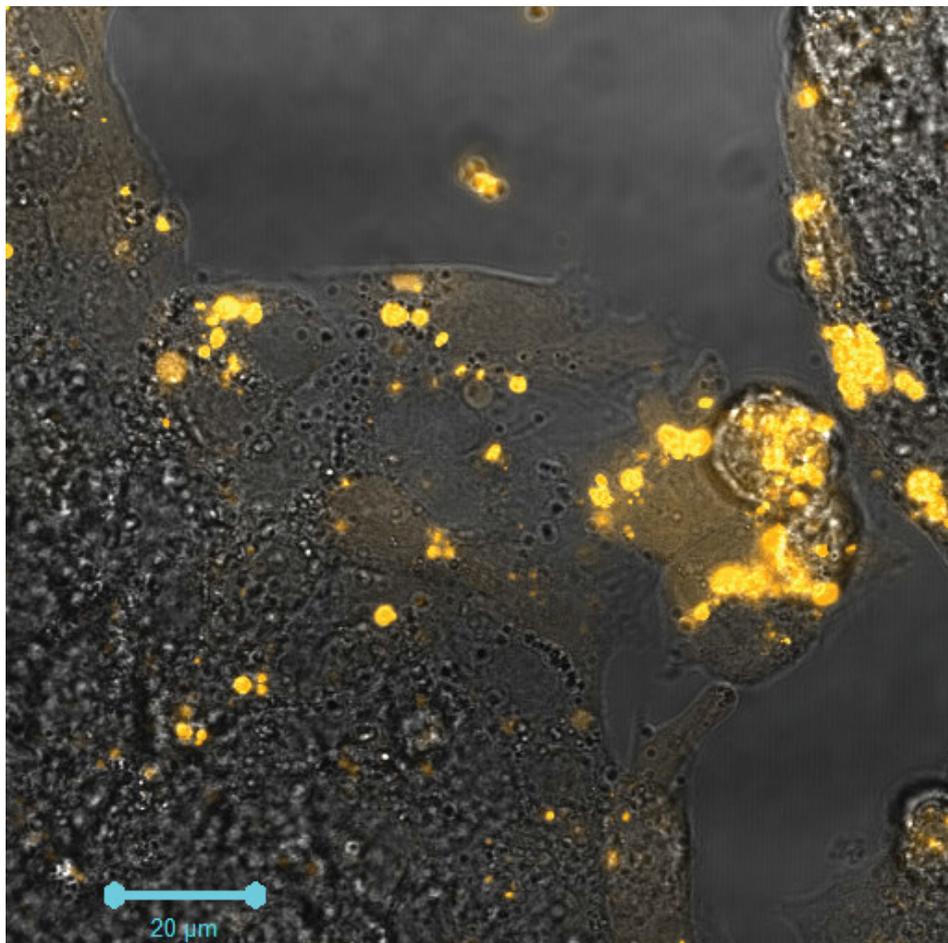


Abb. 65) Hep G2-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNS AF488. Aufgenommen mit 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv, 5% Laser-Verstärkung, 488 nm-Argon-Laser. Die fluoreszenzmarkierte siRNS (orange, falschfarben) ist innerhalb der Zellen in punktförmigen Strukturen lokalisiert. In manchen Zellen kommt es auch zu einer gleichmäßigen Lokalisation der siRNS im Zytoplasma.

Abb. 65 zeigt das Ergebnis der Transfektion von Hep G2-Zellen 24 h nach Transfektion. Wie bei N2A-Zellen sind auch hier vor allem punktförmige orangefarbene Strukturen zu erkennen und die wenigsten Zellen sind gleichmäßig orange gefärbt. Das gleiche gilt bis zu 120 h nach Transfektion, da die Aufnahmen zu einem späteren Zeitpunkt denen von 24 h nach Transfektion gleichen.

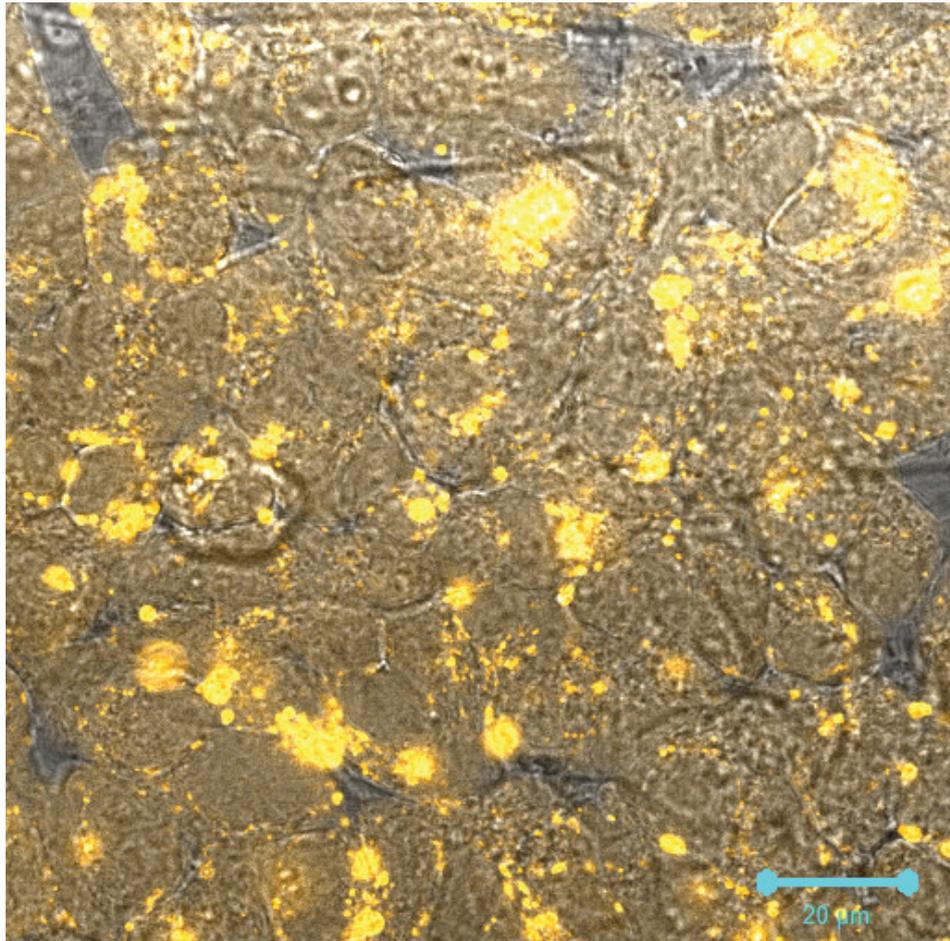


Abb. 66) HEK293-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNA AF488. Aufgenommen mit 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv, 5% Laser-Verstärkung, 488 nm-Argon-Laser. Die fluoreszenzmarkierte siRNA (orange, falschfarben) ist innerhalb der Zellen in punktförmigen Strukturen lokalisiert. In den Zellen kommt es außerdem zu einer gleichmäßigen Lokalisation der siRNA im Zytoplasma.

Eine völlig andere Verteilung der Fluoreszenz (und damit der siRNA) sieht man für HEK293-Zellen 24 h nach Transfektion. Zwar gibt es im Vergleich zu N2A- und Hep G2-Zellen auch hier punktförmige orangefarbene Strukturen, in allen Zellen ist jedoch auch eine gleichmäßige orangefarbene Färbung des Zytoplasmas zu beobachten. Dies ist auch bis zu 72 h nach Transfektion zu beobachten (danach waren die Zellen zu dicht gewachsen).

Für HeLa-Zellen, die wie die HEK293-Zelllinie vom Hersteller als für die Transfektion geeignet eingestuft werden, zeigte sich ein ähnliches Muster wie bei den HEK293-Zellen (Abb. 67).

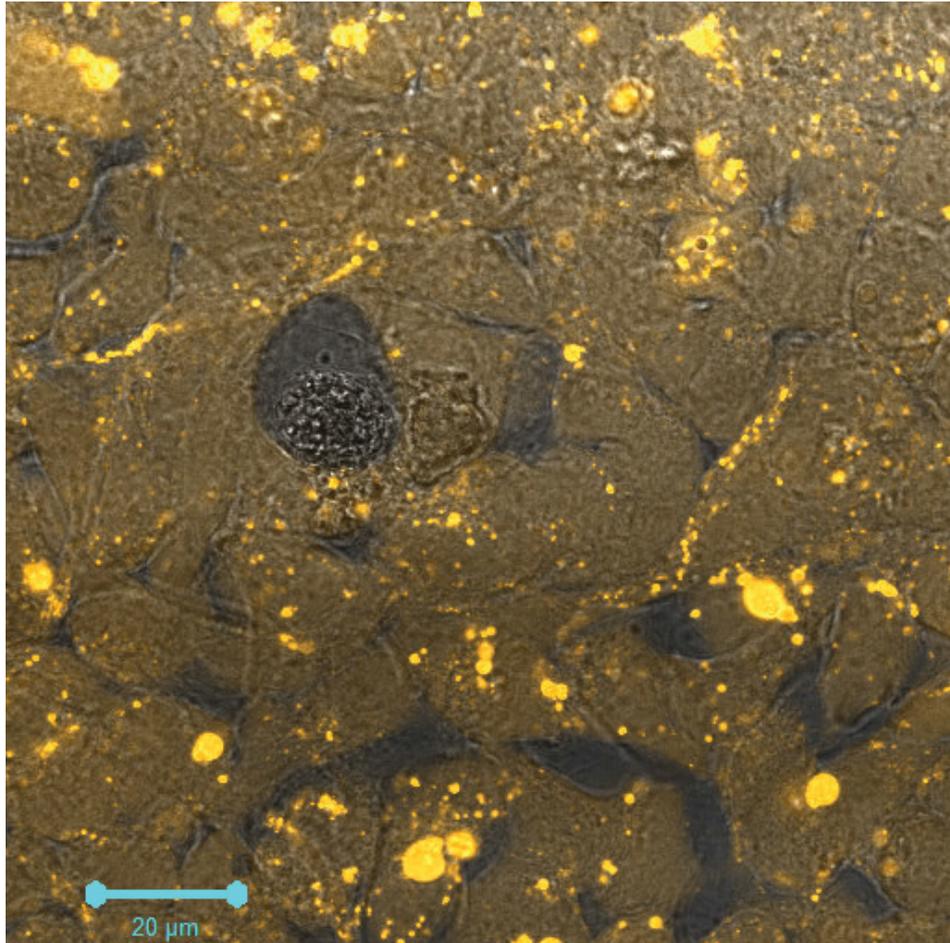


Abb. 67) HeLa-Zellen, 24 h nach Transfektion mit AllStars negative siRNA AF488. Aufgenommen mit 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv, 5% Laser-Verstärkung, 488 nm-Argon-Laser. Die fluoreszenzmarkierte siRNA (orange, Falschfarben) ist innerhalb der Zellen in punktförmigen Strukturen lokalisiert. In den Zellen kommt es außerdem zu einer gleichmäßigen Lokalisation der siRNA im Zytoplasma.

Wie bei den transfizierten HEK293-Zellen zeigt sich bei den HeLa-Zellen bis zu 120 h nach Transfektion neben den punktförmigen orangefarbenen Strukturen ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal im Zytoplasma aller Zellen, was auf eine gleichmäßige Verteilung der siRNA schließen lässt.

Berücksichtigt man die Tatsache, dass diese beiden Zelllinien vom Hersteller getestet und als geeignet bestätigt sind, ist die gleichmäßige Verteilung der siRNA der Phänotyp, der bei einer gelungenen Transfektion erwartet werden sollte. Während HEK293- und HeLa-Zellen mit jeweils 100% Transfektionseffizienz dieser Erwartung entsprechen, ist das bei N2A- und Hep G2-Zellen mit deutlich niedrigerer Transfektionseffizienz nicht der Fall. Da sich die in allen anderen Versuchen verwendete N2A-Zelllinie nicht in geeigneter Weise transfizieren lässt, wird ein Versuch zu RNAi mit DharmaFect1 als Transfektionsreagens wenig erfolgreich sein. Western-Blots mit Zelllysaten von mit siRNA gegen die Phosphatasen transfizierten N2A-Zellen bestätigten diese Vermutung. Eine reduzierte Translation der jeweiligen Phosphatasen konnte zu keinem der getesteten Zeitpunkte nach Transfektion (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) nachgewiesen werden.

4 Diskussion

In diesem Kapitel sollen die erhaltenen Ergebnisse in den Kontext der Literatur eingeordnet werden. Außerdem werden sie hinsichtlich ihrer Übereinstimmung mit den Erwartungen überprüft. Zudem sollen mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung der Versuche aufgezeigt werden. Am Ende wird ein Ausblick auf weiterführende Experimente gegeben und es werden Fragestellungen aufgeworfen, die im Rahmen der weiteren Untersuchung der Regulation der Autophagie durch Phosphatasen von Interesse sein könnten.

4.1 Einordnung der Ergebnisse

Die Tatsache, dass für die Inhibition der Phosphatasen in dieser Arbeit niedrigere Werte für den Autophagieflux erhalten wurden, entspricht den Erwartungen. Bei niedrigerer Phosphataseaktivität von PP2A sollte durch die Inhibition von mTORC1 oder PKB/Akt durch PP2A aufgehoben sein. Damit wird die Inhibition der Autophagie durch diese Proteine über den ULK1/2-Komplex aktiviert. Ähnliches gilt für die Inhibition der PTP-Phosphatasen PTP1B und SHP2 sowie für PTEN. Insofern entsprechen die Ergebnisse für die neuronale Zelllinie N2A also denen für andere Zelllinien.

Interessant ist in dieser Hinsicht die Tatsache, dass unter stimulierenden Bedingungen für die meisten Inhibitoren dennoch ein Anstieg des Autophagieflux zu beobachten war. Dieser Anstieg wurde bei einer Inhibition der Phosphatasen nicht erwartet. An dieser Stelle gilt es zu überlegen, welche Mechanismen in der Zelle bei Inhibition von in der Regulation der Autophagie wichtigen Phosphatasen zu Autophagiestimulation führen könnten. Ebenso sollen in die Autophagieregulation involvierte Prozesse aufgezeigt werden, für die noch keine Beteiligung einer Phosphatase nachgewiesen wurde, aber theoretisch möglich wäre. In den nächsten Kapiteln sollen dazu einige Beispiele gegeben werden.

4.1.1 Die Phosphorylierung von Proteinen der LC3-Familie

In der HeLa-, der 293T- und der SH-SY5Y-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Proteinkinase A (PKA) Proteine der LC3-Familie an einem Serinrest (z.B. Ser12 in LC3A) phosphorylieren können. Diese Phosphorylierung inhibiert den Einbau der LC3-Proteine in die Membran des Autophagosoms [218]. Auch eine Phosphorylierung durch Proteinkinase C, welche für LC3B spezifisch ist, konnte beobachtet werden [219]. Diese Phosphorylierungen wirken sich negativ auf die Stimulation von Autophagie aus. Es wäre möglich, dass diese Reaktionen durch die Aktivität von Serin/Threonin-Phosphatasen (z.B. PP2A) rückgängig gemacht werden können. Damit wäre die Aktivität einer solchen Phosphatase für die Autophagie aktivierend, Inhibitoren einer solchen Phosphatase hätten auf die Autophagie einen inhibierenden Effekt. Insofern kommt dieser Effekt als Erklärung für den in dieser Arbeit beobachteten Anstieg des Autophagieflux unter Hungerbedingungen nur dann in Frage, wenn er diesen etwas abmildern würde. Das kann allerdings mit den hier durchgeführten Experimenten nicht festgestellt werden, so dass hierüber im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden kann. Daher wären weiterführende Versuche zur Identifikation einer Serin-/Threonin-Proteinphosphatase, die als „Gegenspieler“ der PKA fungiert, interessant.

4.1.2 Die Phosphorylierung von Bcl-2

Das Protein *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) ist das namensgebende Protein der Bcl-2-Familie. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind in die Regulation der Apoptose involviert. Dabei gibt es jeweils mehrere Proteine, die pro- oder antiapoptotisch wirken [220]. Eines der antiapoptotischen Proteine ist Bcl-2. Bcl-2 bindet an Beclin1, womit dieses nicht mehr für die Bildung des Beclin1-Vps34-Komplexes zur Verfügung steht. Damit wird durch die Bindung von Bcl-2 und Beclin1 die Makroautophagie inhibiert [221]. Die *c-Jun N-terminal protein kinase 1* (JNK1) kann Bcl-2 an Threonin69, Ser70 und Ser80 phosphorylieren, wodurch die Fähigkeit zur Bindung von Beclin1 verloren geht [222]. Durch diese Phosphorylierung wird also die Makroautophagie aktiviert. Dieser Effekt wird zusätzlich verstärkt durch die Anwesenheit kurzer Sphingolipide, wie z.B. Ceramid C6 [223]. Durch Ceramid C6 wird JNK1 aktiviert und somit Makroautophagie stimuliert. Neben der Aktivierung von JNK1 aktiviert Ceramid C6 auch PP2A, wodurch ebenfalls die Autophagie stimuliert wird (siehe Kapitel 1.4.3). In dieser Arbeit konnte allerdings ein genau gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Bei Stimulation der Makroautophagie durch Hungerbedingungen war der Autophagiefluss gemessen sowohl an LC3B als auch an GABARAP in Anwesenheit von Ceramid C6 nach 4 h niedriger als bei Inkubation in DMEM. Eine mögliche Erklärung wäre, dass PP2A Bcl-2 an Ser70 dephosphorylieren kann [224]. Eine Dephosphorylierung auch der anderen phosphorylierten Stellen von Bcl-2 wäre ebenfalls denkbar. In diesem Fall würde Bcl-2 wieder Beclin1 binden und die Initiation der Autophagie inhibieren können. Dadurch würde der Effekt der Aktivierung durch JNK1 rückgängig gemacht bzw. abgeschwächt. Andererseits wurde beobachtet, dass durch die Dephosphorylierung durch PP2A Bcl-2 für die Bindung an p53 verfügbar gemacht wird [225], was wiederum dafür sorgen würde, dass Bcl-2 nicht Beclin1 binden könnte. Da in N2A-Zellen noch keine Ergebnisse zu diesem Thema existieren, ist hier der Raum für Spekulationen und weitergehende Forschung offen.

Neben der Bindung von Beclin1 wurde für Bcl-2 auch die Bindung von GABARAP beobachtet [226]. Möglicherweise wird diese Bindung auch durch (De-)Phosphorylierungsmechanismen reguliert. So könnte eine Bindung von Bcl-2 an GABARAP die Autophagie inhibieren, wenn z.B. unlipidiertes GABARAP durch diese Bindung den Reaktionen zur Lipidierung entzogen wird.

4.1.3 Die Phosphorylierung von Proteinen des ULK1/2-Komplexes

Proteine des ULK1/2-Komplexes, der am Anfang der Initiation der Autophagie steht, können von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden. So konnte für die AMPK nachgewiesen werden, dass sie durch direkte Phosphorylierung von ULK1 an Ser317 und Ser777 Autophagie stimulieren kann [106, 227]. Auch für diese Phosphorylierung könnte es eine Phosphatase geben, die sie rückgängig macht. In der Tat wurde mit der λ -Proteinphosphatase ein Enzym identifiziert, das durch Dephosphorylierung von ULK1 dessen Aktivität inhibieren kann [228]. Es ist denkbar, dass auch andere Phosphatasen, wie beispielsweise PP2A diese Reaktion katalysieren können.

Eine weitere Phosphorylierungsreaktion, die Auswirkungen auf die Aktivität des ULK1/2-Komplexes hat, ist die Phosphorylierung von ULK1 durch mTORC1. mTORC1 kann ULK1 an Ser757 phosphorylieren, wodurch die Bindung von ULK1 und AMPK verhindert wird [229]. Auf diese Weise bleibt ULK1 bei nährstoffreichen Bedingungen inaktiv und Autophagie wird

nicht aktiviert. Bei Hungerbedingungen überwiegt jedoch die Phosphorylierung von ULK1 durch AMPK, so dass Autophagie aktiviert wird. Auch an dieser Phosphorylierungsstelle könnten Phosphatasen ansetzen, um den Autophagiefluss zu manipulieren.

Eine weitere Möglichkeit der Manipulation des Autophagieflusses durch Phosphatasen besteht bei der Autophosphorylierung von ULK1/2, welche so rückgängig gemacht werden könnte. Somit würde eine Aktivierung der Autophagie verhindert, wenn die entsprechende Phosphatase aktiv ist.

Die Phosphorylierung von mATG13 durch ULK1/2, welche Autophagie-aktivierend wirkt, stellt eine zusätzliche Möglichkeit des Eingreifens einer Phosphatase dar.

Ein Zusammenspiel dieser Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen würde die erhaltenen Ergebnisse erklären (siehe auch Abb. 68). Bei Inhibition der PP2A, z.B. durch Calyculin oder Okadainsäure, findet in nährstoffreichem Medium fast kein Autophagiefluss statt. Wenn PP2A unter nährstoffreichen Bedingungen in Abwesenheit eines Inhibitors die Phosphorylierung von ULK1/2 durch AMPK (die bei diesen Bedingungen nur in geringem Maße stattfindet) rückgängig machen würde, so dass eine Aktivierung von Autophagie auf diesem Wege kaum stattfindet und gleichzeitig mTORC1 durch Dephosphorylierung so weit inhibiert, dass Autophagie durch ULK1/2 aktiviert werden kann, resultiert daraus ein basaler Autophagiefluss (Abb. 68 A). In Anwesenheit eines Inhibitors von PP2A (wie Calyculin A oder Okadainsäure) bei nährstoffreichen Bedingungen könnte PP2A mTORC1 nicht mehr inaktivieren und mTORC1 könnte seine inhibitorische Funktion auf ULK1/2 ausüben. Da die Aktivierung durch AMPK bei nährstoffreichen Bedingungen ohnehin sehr gering ist, wäre der Autophagiefluss sehr stark inhibiert (Abb. 68 B). Bei Hungerbedingungen wird nun die Aktivierung der Autophagie durch die Phosphorylierung von ULK1/2 durch AMPK stark hochreguliert. Da PP2A in Anwesenheit eines Inhibitors diese Aktivierung nicht herunterregulieren kann, aber auch keine inhibitorische Wirkung auf den unter diesen Bedingungen ohnehin kaum aktiven mTORC1 ausüben kann, kommt es zu einer Erhöhung des Autophagieflusses (Abb. 68 D), die jedoch nicht so hoch ausfallen kann wie die in Abwesenheit eines Inhibitors unter Hungerbedingungen. In diesem Fall würde die Inhibition von mTORC1 durch PP2A dafür sorgen, dass keine Inhibition von ULK1/2 durch mTORC1 auftritt, während die Aktivierung von AMPK nicht durch die inhibitorische Funktion von PP2A „aufgefangen“ werden kann (Abb. 68 C). Diese Interpretation würde zu den erhaltenen Ergebnissen für Okadainsäure, Calyculin A und Fostriecin passen.

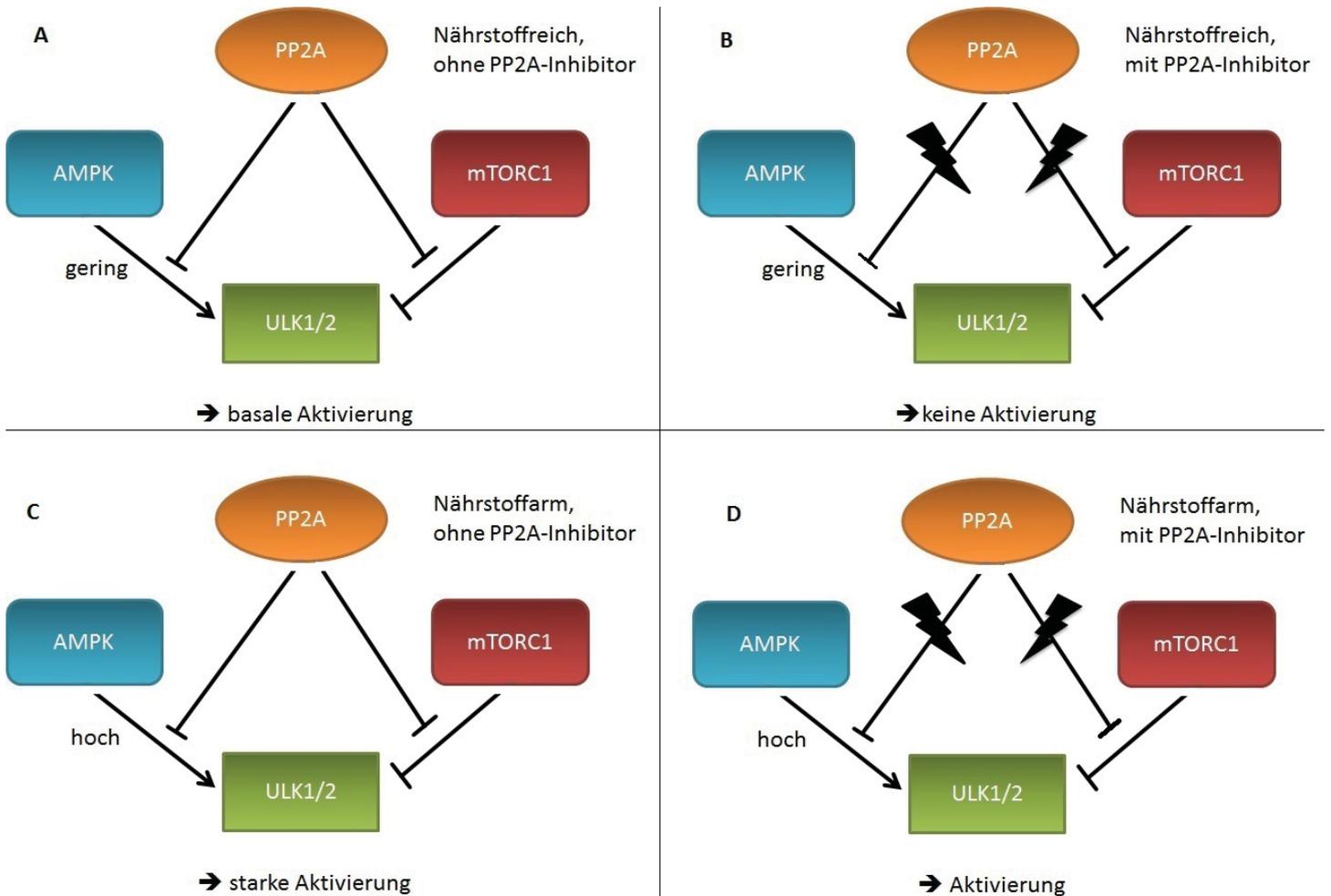


Abb. 68) Modell für den Effekt von PP2A auf die Aktivierung der Autophagie. Die Kinasen AMPK und mTORC1 aktivieren bzw. inhibieren ULK1/2 durch Phosphorylierung. Diese beiden Effekte werden durch PP2A inhibiert. In der oberen Reihe (A und B) der Effekt von PP2A bei nährstoffreichen Bedingungen, in der unteren Reihe (C und D) der Effekt von PP2A unter nährstoffarmen Bedingungen. Wird der Effekt von PP2A inhibiert (B und D, Blitze) kommt es zu einer Veränderung der Aktivierung der Autophagie.

4.1.4 Die Phosphorylierung von mTORC1

Wie bereits in einigen vorangegangenen Kapiteln erwähnt, ist auch mTORC1 Ziel von Phosphorylierungen, die sich unterschiedlich auf die Aktivität des Komplexes auswirken. So kommt es zu einer Inhibition von mTORC1 durch Dephosphorylierung durch PP2A.

Die Phosphorylierung von mTORC1-Proteinen findet z.B. durch ULK1/2 statt, das Raptor phosphoryliert und die Bildung des mTORC1 inhibiert [230]. Die Autoren berichten, dass durch diese Phosphorylierung bei anhaltenden Hungerbedingungen als Rückkopplung dient, um die Aktivität von mTORC1 niedrig zu halten. So kann die Zelle auch einen länger andauernden Mangel an Nährstoffen und Grundbausteinen durch Autophagie kompensieren. Eine Dephosphorylierung von Raptor unter Hungerbedingungen würde zu einem niedrigeren Autophagiefluss führen.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Ergebnisse kann über einen Einfluss der in dieser Arbeit untersuchten Phosphatasen an dieser Stelle jedoch keine Aussage getroffen werden.

4.1.5 Die Phosphorylierung des IR

Die Ergebnisse, die für den Inhibitor bpV(OH)pic erhalten wurden, entsprechen dem, was man für einen PTP1B-Inhibitor erwarten würde. Der Effekt des Inhibitors ist in Abb. 69 dargestellt.

Unter nährstoffreichen Bedingungen (d.h. wenn im Medium Nährstoffe und Wachstumsfaktoren vorliegen), ist der IR aktiv. Wird PTP1B nicht inhibiert, so kann sie die Inhibition der Autophagie durch mTORC1, welche von einem aktiven IR ausgelöst wird abmildern, indem sie z.B. die Autophosphorylierung des IR inhibiert. Es kommt zu einer basalen Aktivierung der Autophagie (Abb. 69 A). Liegt im Medium jedoch bpV(OH)pic vor, ist diese Abmilderung nicht mehr gegeben. Dadurch sinkt die Aktivierung der Autophagie auf ein sehr niedriges Niveau (Abb. 69. B). Unter Hungerbedingungen ist der Signalweg des IR nur geringfügig aktiv. Die aktive PTP1B inhibiert den Signalweg zusätzlich, mTORC1 ist kaum noch aktiv und es kommt zu einer starken Aktivierung des Autophagieflusses (Abb. 69 C). In Anwesenheit von bpV(OH)pic ist die PTP1B nicht mehr aktiv und es kommt zu einer schwachen Inhibition der Autophagie durch einen lediglich basal aktiven IR-Signalweg (Abb. 69 D). Dies stimmt mit den Ergebnissen für bpV(OH)pic überein.

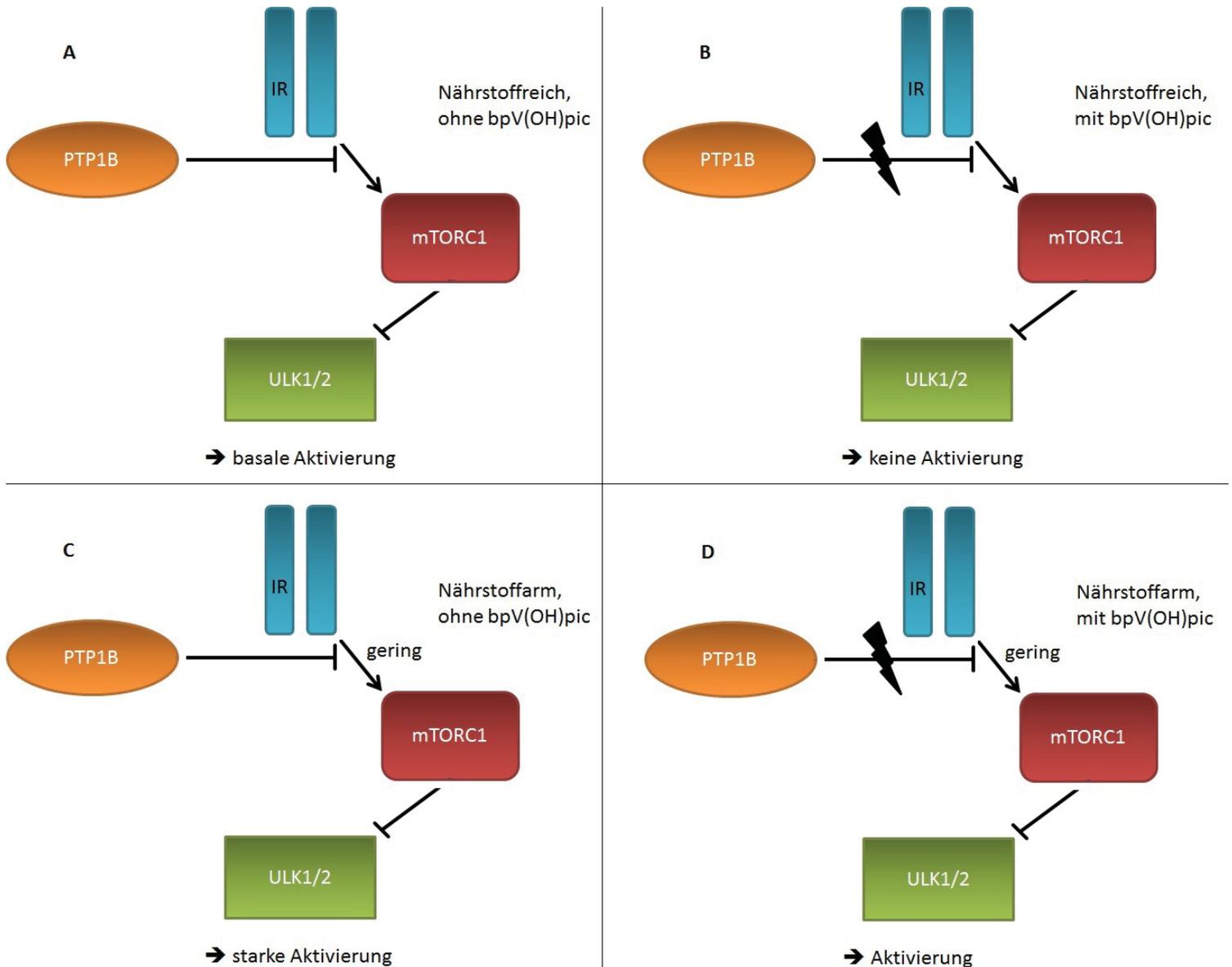


Abb. 69) Modell für den Effekt von PTP1B auf die Aktivierung der Autophagie. Der Insulinrezeptor (IR) aktiviert mTORC1, welches wiederum ULK1/2 durch Phosphorylierung inhibiert. Die Autophosphorylierung des IR, die die Aktivierung des Signalwegs auslöst, wird von PTP1B inhibiert. In der oberen Reihe (A und B) der Effekt von PTP1B bei nährstoffreichen Bedingungen, in der unteren Reihe (C und D) der Effekt von PTP1B unter nährstoffarmen Bedingungen. Wird der Effekt von PTP1B inhibiert (B und D, Blitze) kommt es zu einer Veränderung der Aktivierung der Autophagie.

4.1.6 Zusammenfassung der Regulation von Autophagie durch Phosphatasen

Alles in allem gibt es für Phosphatasen zahlreiche Möglichkeiten, durch Dephosphorylierung von Proteinen oder Signalmolekülen wie PIP₃ die Aktivität der Autophagie zu regulieren. Ohne dass es den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, können viele dieser Möglichkeiten nicht erwähnt werden. Zusätzlich gibt es weitere Phosphatasen, die in dieser Arbeit bisher nicht erwähnt wurden, für die aber ein Zusammenhang mit der Autophagieregulation

diskutiert wird. Nur ein Beispiel dafür ist die Phosphoinositid-3-Phosphatase Jumpy, die das durch Atg18 und Atg9 organisierte Wachstum der Phagophore negativ reguliert [231].

In Abb. 70 werden einige Autophagie-regulierende Schritte, bei denen Phosphorylierung eine wichtige Rolle spielt, dargestellt. Es wird deutlich, dass wegen der vielfältigen Möglichkeiten Autophagie, durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Schlüsselproteinen zu beeinflussen, sowie der Fähigkeit der meisten Phosphatasen verschiedene Proteine im gleichen Signalweg mit unterschiedlichem Effekt durch Dephosphorylierung zu regulieren, die Erforschung der Bedeutung von Phosphatasen ein weiterhin spannendes Feld bleiben wird.

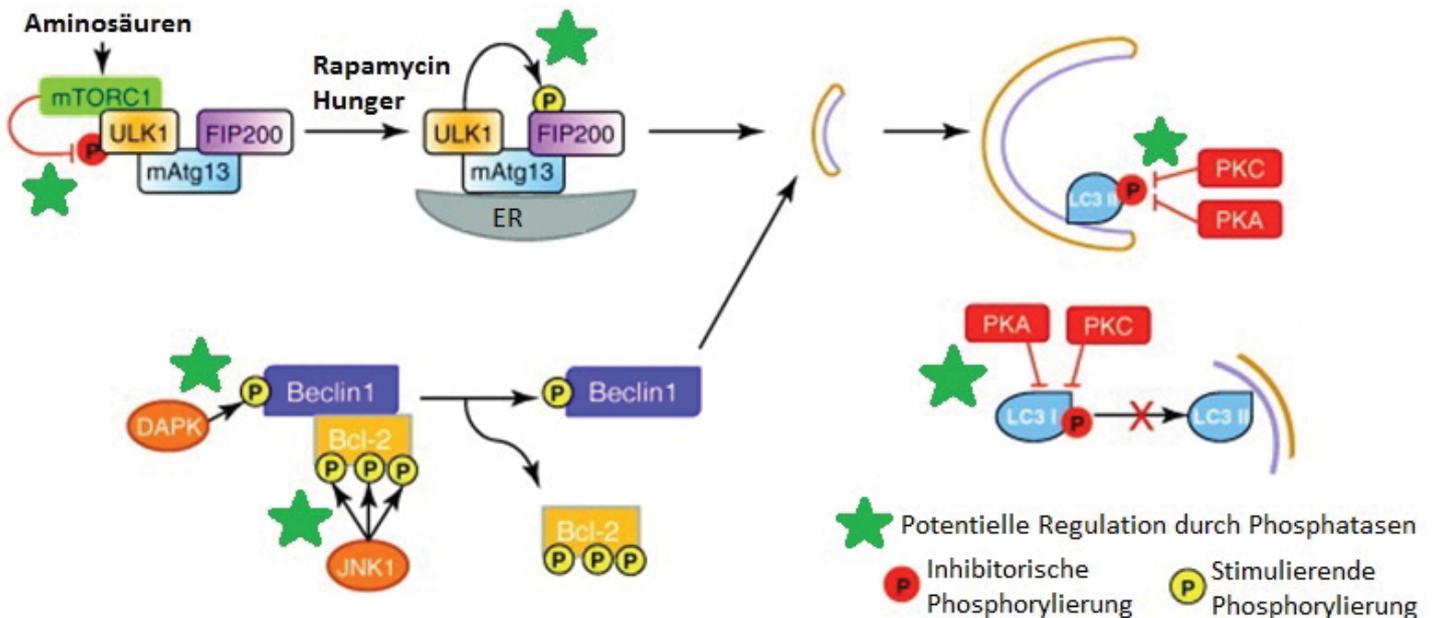


Abb. 70) Möglichkeiten der Regulation der Autophagie durch Phosphatasen (modifiziert nach [232]). Die grünen Sterne zeigen Phosphorylierungsreaktionen, die durch Phosphatasen rückgängig gemacht werden könnten. Dabei können sowohl Phosphorylierungen das Ziel sein, die sich stimulierend auf die Autophagie auswirken (gelbe, mit „P“ markierte Kreise), als auch Phosphorylierungen, die sich inhibitorisch auf die Autophagie auswirken (rote, mit „P“ markierte Kreise).

In der in dieser Arbeit untersuchten neuronalen Zelllinie N2A unterscheiden sich die Ergebnisse in der Tendenz nicht von denen, die man z.B. auch für Leberzellen erwarten würde. Es konnte durch den Einsatz von Phosphatasemodulatoren gezeigt werden, dass die Aktivität einiger Phosphatasen starke Auswirkungen auf den Autophagiefluss hat. Dazu wurde hier beispielhaft für PP2A und PTP1B ein Modell postuliert, wie der Einfluss der Phosphatasen auf den Autophagiefluss stattfinden könnte. Ob dieser Einfluss z.B. bei neurodegenerativen Krankheiten eine Rolle spielt und in welcher Ausprägung bzw. an welcher Stelle genau, wird Gegenstand weiterer Forschung sein müssen.

4.2 Fehlerdiskussion

Bei der Arbeit im Labor kann es zu verschiedenen Fehlern kommen, auf die in diesem Kapitel eingegangen werden soll.

Neben Fehlern, die nicht verhindert werden können, wie intrinsischen Messfehlern von Pipetten, Messzylindern und anderem Labormaterial oder -geräten, treten weitere Fehler auf.

Bei den Versuchen mit den Phosphatasemodulatoren kann es wegen der unterschiedlichen Membranpermeabilität der Modulatoren zu unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen ebendieser kommen. Dadurch ist es ggfs. schwieriger, die Ergebnisse der unterschiedlichen Modulatoren miteinander zu vergleichen. Ein Modulator, der membranpermeabel ist, wird innerhalb der Zelle in einer höheren Konzentration vorliegen und daher die entsprechende Phosphatase mit höherer Wahrscheinlichkeit inhibieren als ein Modulator, der die Zellmembran nur schlecht passieren kann. Aus diesem Grund ist auch nicht zwingend gewährleistet, dass ein Modulator intrazellulär noch in einer Konzentration im Bereich des jeweiligen IC50-Wertes vorliegt.

Außerdem weisen viele der kommerziell erhältlichen Phosphatasemodulatoren (wie auch manche der in dieser Arbeit verwendeten) Spezifität für mehrere Phosphatasen auf, da sich die eng miteinander verwandten Phosphatasen in ihrer Sequenz, Struktur und/oder dem Aufbau ihres aktiven Zentrums gleichen. Es kann daher nicht immer eine Aussage über die Auswirkung einer bestimmten Phosphatase gemacht werden, da auch andere Phosphatasen inhibiert werden. Dadurch kann es zur gegenseitigen Aufhebung der Effekte oder zu Synergien kommen, die nicht immer vorhersagbar sind.

Da auch viele der Phosphatasen mehr als ein Zielprotein dephosphorylieren können (und evtl. auch noch nicht alle dieser Zielproteine bekannt sind), kann es zu verschiedenen Effekten kommen, die sich ebenfalls wiederum gegenseitig aufheben oder verstärken können. Zudem gibt es für viele Proteine durch Rückkopplungsschleifen, veränderte Expressionsmuster oder parallele Stoffwechselwege Möglichkeiten für die Zelle, einen Ausfall oder auch Überaktivität zu kompensieren.

Eine weitere Fehlerquelle könnte die ständige Temperaturveränderung sein, die dadurch entsteht, dass die Multiwell-Platten für die Gewinnung der Lysate mehrfach aus dem Inkubator genommen werden müssen. Das bedeutet für die Zellen Stress, wodurch Autophagie ausgelöst werden kann. Die Vorbereitung für die Gewinnung der Lysate dauert etwa eine Viertelstunde, ein Zeitraum, in dem durchaus Veränderungen des Autophagieflusses ausgelöst werden können. All das verfälscht die Ergebnisse, ist aber, außer durch möglichst zügiges Arbeiten, kaum zu verhindern.

Dazu kommt, dass nicht jedes Experiment insbesondere bzgl. der Bearbeitungszeit der Lysate ganz genau gleich durchgeführt werden kann.

Die Lagerung der Lysate bei -20°C bis zur Verwendung für die SDS-PAGE kann einen negativen Effekt auf die Qualität der Probe haben, da nicht alle Proteine das Einfrieren und Auftauen gut vertragen oder im Zelllysate (dauerhaft) in Lösung stabil sind.

Durch das niedrige Signal der Positivkontrolle sind insbesondere die Werte für Ethyl-3,4-dephostatin stark erhöht (siehe Kapitel 3.3.1.6).

Außerdem wurden die Versuche für die Zeitreihen und bei der Inkubation für 4 h in Anwesenheit der Modulatoren jeweils nur einmal durchgeführt. Für 4 h sind also nur zwei Messwerte vorhanden. Daher dürfte das Signifikanzniveau der Intensitätswerte relativ niedrig sein.

Bei den Versuchen zu RNSi konnte eine effiziente Transfektion der N2A-Zelllinie nicht erreicht werden. Ein möglicher Grund ist, dass das Transfektionsreagens nicht zur Transfektion von N2A-Zellen geeignet ist. Dazu müssten auch andere Transfektionsreagenzien getestet werden.

4.3 Ausblick

Um eine höhere Signifikanz für die Ergebnisse zu erhalten, sollten die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mehrmals durchgeführt werden.

Zudem könnte in weiteren Experimenten die Transfektion mit siRNS optimiert werden um den Effekt der gezielten Herabregulation einer Phosphatase genauer charakterisieren zu können. Ebenso wäre es denkbar zwei oder mehr der Phosphatasemodulatoren in einem Versuchsansatz miteinander zu kombinieren. So können genauere Aussagen über die Auswirkungen des Ausfalls einer spezifischen Phosphatase, aber auch über den Ausfall einer Kombination von Phosphatasen gemacht werden. Die Experimente könnten zusätzlich an einer humanen neuronalen Zelllinie (z.B. SH-SY5Y) durchgeführt werden, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen gewährleisten zu können. Auch Experimente an Zellen, die stabil Phosphatasegene überexprimieren, würden ein genaueres Bild über den Einfluss von Phosphatasen ermöglichen.

Gerade was den Einsatz von Phosphatasemodulatoren als mögliche autophagieselektive Wirkstoffe zur Bekämpfung von neurodegenerativen Krankheiten betrifft, wäre auch die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit Zelllinien interessant, die bei den Krankheiten wichtige Proteine (z.B. α -Synuclein oder APP) überexprimieren.

Eine weitere Möglichkeit die Effekte einer Phosphatase zu studieren, wäre die Entwicklung von Zelllinien, die die Gene für phosphorylierungs- oder dephosphorylierungsdefiziente, putative Zielproteine stabil überexprimieren (z.B. ULK1, das an den Serinen 317 und/oder 777 eine Punktmutation zu Alanin aufweist). Zudem wären Mutationen von putativen Phosphatase-Zielproteinen denkbar, die die entsprechende Phosphatase nicht mehr binden können bzw. die eine mutierte Erkennungssequenz enthalten.

Auch Experimente, mit denen eine Kolo-kalisation von Phosphatasen mit dem möglichen Zielprotein festgestellt werden könnte, lägen im Bereich des Möglichen. Dazu bietet sich die Fluoreszenzmarkierung der Phosphatase und des Zielproteins an (z.B. durch *Green Fluorescent Protein* (GFP) und dessen Derivate). Die Zellen die die Gene für derartige Konstrukte überexprimieren, könnten dann mit (hochauflösenden) mikroskopischen Verfahren (z.B. konfokale LSM oder *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie) auf die Kolo-kalisierung von Phosphatase und Zielprotein hin untersucht werden. Außerdem kann so der Ort innerhalb der Zellen, an dem die Dephosphorylierung stattfindet genauer charakterisiert werden.

Weiterhin könnten Experimente zur Charakterisierung von Bindungen der Phosphatase und den putativen Zielproteinen durchgeführt werden. Als solche Experimente bieten sich beispielsweise Phagendisplay-Versuche an, mit denen auf Bindungsmotive der entsprechenden Proteine gescreent werden kann. Auch Pull-Down- oder Koimmunopräzipitations-Experimente können zur Aufklärung einer möglichen Bindung herangezogen werden. So könnten evtl. auch neue Bindungspartner identifiziert werden.

Ausgehen von *In-vitro*-Daten, könnten auch Versuche an Tiermodellen durchgeführt werden, damit die Auswirkungen von Mutationen der Phosphatasen oder Modulatoren auf den gesamten Organismus untersucht werden können.

Insgesamt stellt die Forschung an Phosphatasen in der Autophagieregulation ein bisher nur wenig bearbeitetes, jetzt und auch in Zukunft weites und an Erkenntnisgewinn reiches Feld dar - Ansatzmöglichkeiten für Therapien von zahlreichen Zivilisations- und Infektionskrankheiten sowie altersbedingten Krankheiten und Symptomen nicht ausgeschlossen.

5 Zusammenfassung

Autophagie (griechisch: *auto* für „selbst“, *phagein* für „essen“) ist ein in allen Eukaryoten - von einzelligen Hefen bis zum Menschen - stattfindender Prozess, der dem Abbau nicht (mehr) benötigter, fehlerhafter oder pathogener Bestandteile des Zytoplasmas sowie der Gewinnung neuer Grundbausteine und Energieträger dient. Bei extra- oder intrazellulärem Stress kann so die Homöostase aufrechterhalten werden. Wegen seiner Wichtigkeit für das Überleben der Zelle ist Autophagie ein durch zahlreiche Stoffwechselwege regulierter Prozess. Fehlfunktionen können für den gesamten Organismus gravierende Konsequenzen haben. So können Störungen im Ablauf oder der Regulation der Autophagie häufig bei schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs, der Alzheimer-Demenz, Diabetes, HIV- oder Hepatitis-Infektionen, aber auch bei Alterungsprozessen oder Übergewicht beobachtet werden. Diese Krankheiten verursachen jedes Jahr zahlreiche Todesfälle, zeichnen Menschen und sorgen für erhebliches Leid. Auch die ausgelösten Schäden für die Gesundheitssysteme sind immens. Der Einfluss von Phosphatasen ist bisher im Vergleich zu dem von Kinasen in der Forschung zur Regulation der Autophagie relativ wenig erforscht. In dieser Arbeit soll durch den Einsatz von Phosphatasemodulatoren ein Beitrag dazu geleistet werden, die Funktion von Phosphatasen als Autophagieregulatoren - insbesondere in neuronalen Zellen - aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Effekt von verschiedenen Phosphatasen auf die Autophagieregulation in der neuronalen Zelllinie Neuro 2A festgestellt werden. Der Effekt der Proteinphosphatase 2A (PP2A)-Inhibitoren, Okadainsäure, Fostriecin und Calyculin A legt eine Involvierung der PP2A in die Autophagieregulation in neuronalen Zellen nahe. Unter regulären Bedingungen findet bei Inhibition der PP2A kein Autophagiefluss statt. Bei Stimulation der Autophagie durch Hungerbedingungen wurde ein gesteigerter Autophagiefluss festgestellt, dieser erreichte jedoch nicht das Niveau der Kontrolle ohne Inhibitor. Vergleichbare Ergebnisse lieferte der Einsatz des Proteintyrosinphosphatase 1B (PTP1B)-Inhibitors bpV(OH)pic. Bei Verwendung dieses Inhibitors unter regulären Kulturbedingungen war der Autophagiefluss zur Gänze unterdrückt, was teilweise durch Autophagiestimulation durch Hungerbedingungen rückgängig gemacht werden konnte.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und mit den aus der Literatur bekannten Daten zu Signalwegen, die an der Autophagieregulation beteiligt sind, konnte ein Modell der Regulationsmechanismen durch PP2A in neuronalen Zellen erstellt werden. PP2A macht die aktivierende Phosphorylierung der *unc-51-like kinase* (ULK) 1/2 durch Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase (AMPK) rückgängig und inhibiert gleichzeitig den *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1), eine Kinase, die ULK1/2 inhibiert. ULK1/2 ist für die Induktion der Autophagie verantwortlich. Auch für PTP1B konnte ein Modell erstellt werden, in dem die Integration dieser Phosphatase mit inhibierender Wirkung auf den Insulinrezeptor in den damit verbundenen Signalweg gelingt. Damit führt eine Inhibition dieses Signalwegs durch PTP1B in neuronalen Zellen zur Aktivierung des Autophagieflusses. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in neuronalen Zellen die Regulation der Autophagie durch Phosphatasen auf ähnliche Weise verläuft wie in besser charakterisierten Zelltypen anderer Gewebe.

6 Summary

Autophagy (from Greek *auto* meaning “self”, *phagein* meaning “to eat”) denotes a process employed by all eukaryotes, from yeast to human, to degrade unnecessary, defective or pathogenic parts of the cytoplasm and to recycle their building blocks for biosynthetic or energy-providing pathways. During times of extra- or intracellular stress autophagy serves as a means to uphold homeostasis. Due to its importance for cell survival, autophagy is tightly regulated by a number of metabolic pathways. Dysfunctional autophagy may have grave consequences for the entire organism. Malfunctions in the process or regulation of autophagy are often observed during dire diseases like cancer, Alzheimer’s disease, diabetes, HIV- and hepatitis virus infections, but also during aging processes or in obesity. Each year all of these diseases cause a great number of deaths, scar people and are responsible for major suffering of humans. Moreover, they are also the reason for major financial burden of healthcare systems. The involvement of phosphatases has not yet gained as much attention by researchers in the field of autophagy regulation as have their counterparts, the kinases. This work was performed to obtain a clearer picture of the role of phosphatases as autophagy regulators, especially in neuronal cells, by using a range of phosphatase modulators.

In this work an effect of several different phosphatases on autophagy in the neuronal cell line Neuro 2A could be observed. The application of protein phosphatase 2A (PP2A) inhibitors okadaic acid, calyculin A or fostriecin, revealed a major involvement of this phosphatase in neuronal cell autophagy regulation. Cells grown in normal growth medium in the presence of one of the inhibitors of PP2A showed an autophagic flux that was reduced to below basal level. Stimulating autophagy by incubating the cells in starvation medium and thereby withdrawing nutrients and growth factors led to an increase in autophagic flux, which remained below the levels present in control cells grown without any inhibitor. Similar results were obtained for the application of bpV(OH)pic, a protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitor. Incubating cells with this inhibitor in normal growth medium led to total suppression of autophagic flux which could be partly reversed by stimulation through starvation.

On the basis of these results and the established facts about autophagy regulation and cellular signaling pathways, a model explaining the role of PP2A in autophagy of neuronal cells has been created. PP2A reverses the autophagy activating phosphorylation of unc-51-like kinase (ULK) 1/2 by adenosine monophosphate-dependent protein kinase (AMPK) while simultaneously inhibiting the mammalian target of rapamycin complex (mTORC) 1, a ULK1/2-inhibiting kinase. ULK1/2 is important in the initiation of autophagy. Another model was established for PTP1B, which successfully incorporates this phosphatase with an inhibitory effect on the insulin receptor into the connected signaling pathway. An inhibition of this signaling pathway in neuronal cells by PTP1B leads to an activation of autophagy. Altogether, the results of this work indicate that regulation of autophagy by phosphatases in neuronal cells proceeds in a similar fashion as in better-characterized cell types of other tissues.

7 Literaturverzeichnis

- [1] C. DE DUVE, R. WATTIAUX: Functions of lysosomes. In: *Annual review of physiology* 28 (1966), S. 435-492.
- [2] S.L. CLARK: Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. In: *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 3 (1957), S. 349-362.
- [3] H.L. CHIANG, J.F. DICE: Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988), S. 6797-6805.
- [4] N.T. NEFF, L. BOURRET, P. MIAO, J.F. DICE: Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts. In: *Journal of Cell Biology* 91 (1981), S. 184-194.
- [5] R. KIFFIN, C. CHRISTIAN, E. KNECHT, A.M. CUERVO: Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. In: *Molecular biology of the cell* 15 (2004), S. 4829-4840.
- [6] R. KIFFIN, S. KAUSHIK, M. ZENG, U. BANDYOPADHYAY, C. ZHANG, A.C. MASSEY, M. MARTINEZ-VICENTE, A.M. CUERVO: Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. In: *Journal of cell science* 120 (2007), S. 782-791.
- [7] H.-L. CHIANG, C. PLANT, J. DICE: A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. In: *Science* 246 (1989), S. 382-385.
- [8] J. HÖFELD, Y. MINAMI, F.-U. HARTL: Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. In: *Cell* 83 (1995), S. 589-598.
- [9] K. RICHTER, J. BUCHNER: hsp90: twist and fold. In: *Cell* 127 (2006), S. 251-253.
- [10] A.M. CUERVO, J.F. DICE: A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. In: *Science* 273 (1996), S. 501-503.
- [11] K. OKAMOTO: Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. In: *The Journal of cell biology* 205 (2014), S. 435-445.
- [12] J.B. KUNZ, H. SCHWARZ, A. MAYER: Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), S. 9987-9996.
- [13] J.-C. FARRÉ, R. KRICK, S. SUBRAMANI, M. THUMM: Turnover of organelles by autophagy in yeast. In: *Current Opinion in Cell Biology* 21 (2009), S. 522-530.
- [14] P. ROBERTS, S. MOSHITCH-MOSHKOVITZ, E. KVAM, E. O'TOOLE, M. WINEY, D.S. GOLDFARB: Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular biology of the cell* 14 (2003), S. 129-141.
- [15] M. SAKAI, K. OGAWA: Energy-dependent lysosomal wrapping mechanism (LWM) during autophagolysosome formation. In: *Histochemistry* 76 (1982), S. 479-488.
- [16] S.A. TOOZE, T. YOSHIMORI: The origin of the autophagosomal membrane. In: *Nature cell biology* 12 (2010), S. 831-835.
- [17] E.-L. ESKELINEN: The mystery of the membranes. In: *Autophagy* 4 (2008), S. 3-4.
- [18] E.L. AXE, S.A. WALKER, M. MANIFAVA, P. CHANDRA, H.L. RODERICK, A. HABERMANN, G. GRIFFITHS, N.T. KTISTAKIS: Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of Cell Biology* 182 (2008), S. 685-701.
- [19] D. MIJALJICA, C.J. ROSADO, R.J. DEVENISH, M. PRESCOTT: *Biosensors for Monitoring Autophagy*. 2011.
- [20] R.P. BOLENDER, E.R. WEIBEL: A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment. In: *The Journal of Cell Biology* 56 (1973), S. 746-761.
- [21] M. VEENHUIS, A. DOUMA, W. HARDER, M. OSUMI: Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. In: *Archives of microbiology* 134 (1983), S. 193-203.
- [22] R.J. YOULE, D.P. NARENDRA: Mechanisms of mitophagy. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 12 (2010), S. 9-14.

- [23] E. CEBOLLERO, F. REGGIORI, C. KRAFT: Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. In: *Int J Cell Biol*. 2012:182834. (2012), S. 10.1155/2012/182834. Epub 182012 Feb 182828.
- [24] T. LAMARK, T. JOHANSEN: Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. In: *International journal of cell biology* 2012 (2012).
- [25] W.A. DUNN JR, J.M. CREGG, J.A. KIEL, I.J. VAN DER KLEI, M. OKU, Y. SAKAI, A.A. SIBIRNY, V. STASYK, M. VEENHUIS: Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. In: *Autophagy* 1 (2005), S. 75-83.
- [26] B. LEVINE: Eating Oneself and Uninvited Guests: Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense. In: *Cell* 120 (2005), S. 159-162.
- [27] N. MIZUSHIMA, B. LEVINE, A.M. CUERVO, D.J. KLIONSKY: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. In: *Nature* 451 (2008), S. 1069-1075.
- [28] A.B. NOVIKOFF, E. ESSNER, N. QUINTANA, Golgi apparatus and lysosomes, Federation proceedings, 1964, p. 1010.
- [29] U. PFEIFER: Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles. In: *Acta biologica et medica Germanica* 36 (1976), S. 1691-1694.
- [30] G.E. MORTIMORE, C.M. SCHWORER: Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. In: (1977).
- [31] J. LEE, S. GIORDANO, J. ZHANG: Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. In: *Biochem J*. 441 (2012), S. 523-540. doi: 510.1042/BJ20111451.
- [32] K. JIA, C. THOMAS, M. AKBAR, Q. SUN, B. ADAMS-HUET, C. GILPIN, B. LEVINE: Autophagy genes protect against Salmonella typhimurium infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2009), S. 14564-14569.
- [33] C. DINKINS, J. ARKO-MENSAH, V. DERETIC, Autophagy and HIV, Seminars in Cell & Developmental Biology, Elsevier, 2010, pp. 712-718.
- [34] E.-L. ESKELINEN: The dual role of autophagy in cancer. In: *Current Opinion in Pharmacology* 11 (2011), S. 294-300.
- [35] B. BOLAND, A. KUMAR, S. LEE, F.M. PLATT, J. WEGIEL, W.H. YU, R.A. NIXON: Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease. In: *The Journal of Neuroscience* 28 (2008), S. 6926-6937.
- [36] R. BANERJEE, M.F. BEAL, B. THOMAS: Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. In: *Trends in Neurosciences* 33 (2010), S. 541-549.
- [37] C.-C. TAN, J.-T. YU, M.-S. TAN, T. JIANG, X.-C. ZHU, L. TAN: Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. In: *Neurobiology of Aging* 35 (2014), S. 941-957.
- [38] D.C. RUBINSZTEIN, G. MARIÑO, G. KROEMER: Autophagy and aging. In: *Cell* 146 (2011), S. 682-695.
- [39] A.M. CUERVO: Autophagy and aging: keeping that old broom working. In: *Trends in Genetics* 24 (2008), S. 604-612.
- [40] M. DREUX, F.V. CHISARI: Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. In: *Autophagy* 5 (2009), S. 1224-1225.
- [41] M.G. GUTIERREZ, S.S. MASTER, S.B. SINGH, G.A. TAYLOR, M.I. COLOMBO, V. DERETIC: Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* Survival in Infected Macrophages. In: *Cell* 119 (2004), S. 753-766.
- [42] C. EBATO, T. UCHIDA, M. ARAKAWA, M. KOMATSU, T. UENO, K. KOMIYA, K. AZUMA, T. HIROSE, K. TANAKA, E. KOMINAMI, R. KAWAMORI, Y. FUJITANI, H. WATADA: Autophagy Is Important in Islet Homeostasis and Compensatory Increase of Beta Cell Mass in Response to High-Fat Diet. In: *Cell Metabolism* 8 (2008), S. 325-332.
- [43] A.J. MEIJER, P. CODOGNO: Autophagy: A Sweet Process in Diabetes. In: *Cell Metabolism* 8 (2008), S. 275-276.

- [44] K. TAKESHIGE, M. BABA, S. TSUBOI, T. NODA, Y. OHSUMI: Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. In: *The Journal of Cell Biology* 119 (1992), S. 301-311.
- [45] A. MATSUURA, M. TSUKADA, Y. WADA, Y. OHSUMI: Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Gene* 192 (1997), S. 245-250.
- [46] N. MIZUSHIMA, H. SUGITA, T. YOSHIMORI, Y. OHSUMI: A new protein conjugation system in human The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), S. 33889-33892.
- [47] Y. KABEYA, N. MIZUSHIMA, T. UENO, A. YAMAMOTO, T. KIRISAKO, T. NODA, E. KOMINAMI, Y. OHSUMI, T. YOSHIMORI: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. In: *The EMBO journal* 19 (2000), S. 5720-5728.
- [48] N. HOSOKAWA, T. SASAKI, S.-I. IEMURA, T. NATSUME, T. HARA, N. MIZUSHIMA: Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. In: *Autophagy* 5 (2009), S. 973-979.
- [49] C.A. MERCER, A. KALIAPPAN, P.B. DENNIS: A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. In: *Autophagy* 5 (2009), S. 649-662.
- [50] N. MIZUSHIMA: The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. In: *Curr Opin Cell Biol.* 22 (2010), S. 132-139. doi: 110.1016/j.ceb.2009.1012.1004. Epub 2010 Jan 1016.
- [51] A. ESCLATINE, M. CHAUMORCEL, P. CODOGNO, *Autophagy in Infection and Immunity*, Springer, 2009, pp. 33-70.
- [52] C. BURMAN, N.T. KTISTAKIS: Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. In: *FEBS Letters* 584 (2010), S. 1302-1312.
- [53] C. BURMAN, N.T. KTISTAKIS, *Autophagosomal formation in mammalian cells*, Seminars in immunopathology, Springer, 2010, pp. 397-413.
- [54] Z. XIE, D.J. KLIONSKY: Autophagosomal formation: core machinery and adaptations. In: *Nat Cell Biol* 9 (2007), S. 1102-1109.
- [55] N. MIZUSHIMA, A. KUMA, Y. KOBAYASHI, A. YAMAMOTO, M. MATSUBAE, T. TAKAO, T. NATSUME, Y. OHSUMI, T. YOSHIMORI: Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. In: *Journal of cell science* 116 (2003), S. 1679-1688.
- [56] N. MIZUSHIMA, T. NODA, Y. OHSUMI: Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. In: *The EMBO journal* 18 (1999), S. 3888-3896.
- [57] N. MIZUSHIMA, A. YAMAMOTO, M. HATANO, Y. KOBAYASHI, Y. KABEYA, K. SUZUKI, T. TOKUHISA, Y. OHSUMI, T. YOSHIMORI: Dissection of autophagosomal formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. In: *The Journal of Cell Biology* 152 (2001), S. 657-668.
- [58] T. KIRISAKO, Y. ICHIMURA, H. OKADA, Y. KABEYA, N. MIZUSHIMA, T. YOSHIMORI, M. OHSUMI, T. TAKAO, T. NODA, Y. OHSUMI: The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. In: *The Journal of Cell Biology* 151 (2000), S. 263-276.
- [59] Y. KABEYA, N. MIZUSHIMA, A. YAMAMOTO, S. OSHITANI-OKAMOTO, Y. OHSUMI, T. YOSHIMORI: LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. In: *Journal of Cell Science* 117 (2004), S. 2805-2812.
- [60] Y. ICHIMURA, T. KIRISAKO, T. TAKAO, Y. SATOMI, Y. SHIMONISHI, N. ISHIHARA, N. MIZUSHIMA, I. TANIDA, E. KOMINAMI, M. OHSUMI: A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. In: *Nature* 408 (2000), S. 488-492.
- [61] J. MOHRLÜDER, M. SCHWARTEN, D. WILLBOLD: Structure and potential function of γ -aminobutyrate type A receptor-associated protein. In: *FEBS Journal* 276 (2009), S. 4989-5005.
- [62] S. RANDALL-DEMLLO, M. CHIEPPA, R. ERI: Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. In: *Frontiers in immunology* 4 (2013).
- [63] O.H. WEIERGRÄBER, J. MOHRLÜDER, D. WILLBOLD: Atg8 Family Proteins—Autophagy and Beyond. In: (2013).
- [64] R. WILLIAMS, K.L. WOODS, L. JULIANO, J.C. MOTTRAM, G.H. COOMBS: Characterization of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. In: *Autophagy* 5 (2009), S. 159-172.

- [65] S.S. MANN, J.A. HAMMARBACK: Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), S. 11492-11497.
- [66] S.A. KUZNETSOV, V.I. GELFAND: 18 kDa microtubule-associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP-1). In: *FEBS letters* 212 (1987), S. 145-148.
- [67] H. WANG, F.K. BEDFORD, N.J. BRANDON, S.J. MOSS, R.W. OLSEN: GABAA-receptor-associated protein links GABAA receptors and the cytoskeleton. In: *Nature (London)* 379 (1999), S. 69-72.
- [68] T.A. LEIL, Z.-W. CHEN, C.-S.S. CHANG, R.W. OLSEN: GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. In: *The Journal of neuroscience* 24 (2004), S. 11429-11438.
- [69] H. WANG, R.W. OLSEN: Binding of the GABAA Receptor-Associated Protein (GABARAP) to Microtubules and Microfilaments Suggests Involvement of the Cytoskeleton in GABARAPGABAA Receptor Interaction. In: *Journal of Neurochemistry* 75 (2000), S. 644-655.
- [70] J.T. KITTLER, P. ROSTAING, G. SCHIAVO, J.-M. FRITSCHY, R. OLSEN, A. TRILLER, S.J. MOSS: The Subcellular Distribution of GABARAP and Its Ability to Interact with NSF Suggest a Role for This Protein in the Intracellular Transport of GABAA Receptors. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* 18 (2001), S. 13-25.
- [71] V. MANSUY, W. BOIREAU, A. FRAICHARD, J.-L. SCHLICK, M. JOUVENOT, R. DELAGE-MOURROUX: GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA_A receptor. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 (2004), S. 639-648.
- [72] C. CHEN, J.-G. LI, Y. CHEN, P. HUANG, Y. WANG, L.-Y. LIU-CHEN: GEC1 interacts with the κ opioid receptor and enhances expression of the receptor. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), S. 7983-7993.
- [73] F. GREEN, T. O'HARE, A. BLACKWELL, C.A. ENNS: Association of human transferrin receptor with GABARAP. In: *FEBS Letters* 518 (2002), S. 101-106.
- [74] S. LAÍNEZ, P. VALENTE, I. ONTORIA-OVIEDO, J. ESTÉVEZ-HERRERA, M. CAMPRUBÍ-ROBLES, A. FERRER-MONTIEL, R. PLANELLS-CASES: GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. In: *The FASEB Journal* 24 (2010), S. 1958-1970.
- [75] C. CHEN, Y. WANG, P. HUANG, L.-Y. LIU-CHEN: Effects of C-terminal modifications of GEC1 protein and γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP), two microtubule-associated proteins, on κ opioid receptor expression. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), S. 15106-15115.
- [76] J.L. COOK, R.N. RE, J.M. ABADIE, M. PETERS, J. ALAM: The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor. In: *Circulation research* 102 (2008), S. 1539-1547.
- [77] J. MOHRLÜDER, Y. HOFFMANN, T. STANGLER, K. HÄNEL, D. WILLBOLD: Identification of Clathrin Heavy Chain as a Direct Interaction Partner for the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor Associated Protein[†]. In: *Biochemistry* 46 (2007), S. 14537-14543.
- [78] J. MOHRLÜDER, T. STANGLER, Y. HOFFMANN, K. WIESEHAN, A. MATARUGA, D. WILLBOLD: Identification of calreticulin as a ligand of GABARAP by phage display screening of a peptide library. In: *FEBS Journal* 274 (2007), S. 5543-5555.
- [79] Y. SAGIV, A. LEGESSE-MILLER, A. PORAT, Z. ELAZAR: GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. In: *The EMBO journal* 19 (2000), S. 1494-1504.
- [80] J.E. COYLE, S. QAMAR, K.R. RAJASHANKAR, D.B. NIKOLOV: Structure of GABARAP in Two Conformations: Implications for GABAA Receptor Localization and Tubulin Binding. In: *Neuron* 33 (2002), S. 63-74.
- [81] T. KOUNO, M. MIZUGUCHI, I. TANIDA, T. UENO, T. KANEMATSU, Y. MORI, H. SHINODA, M. HIRATA, E. KOMINAMI, K. KAWANO: Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), S. 24610-24617.

- [82] H. WEIDBERG, T. SHPILKA, E. SHVETS, A. ABADA, F. SHIMRON, Z. ELAZAR: LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. In: *Developmental Cell* 20 (2011), S. 444-454.
- [83] H. WEIDBERG, E. SHVETS, T. SHPILKA, F. SHIMRON, V. SHINDER, Z. ELAZAR: LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. In: *EMBO J* 29 (2010), S. 1792-1802.
- [84] S. PANKIV, T.H. CLAUSEN, T. LAMARK, A. BRECH, J.-A. BRUUN, H. OUTZEN, A. ØVERVATN, G. BJØRKØY, T. JOHANSEN: p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), S. 24131-24145.
- [85] N. VON MUHLINEN, T. THURSTON, G. RYZHAKOV, S. BLOOR, F. RANDOW: NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. In: *Autophagy* 6 (2010), S. 288-289.
- [86] N. VON MUHLINEN, M. AKUTSU, B.J. RAVENHILL, Á. FOEGLIN, S. BLOOR, T.J. RUTHERFORD, S. FREUND, D. KOMANDER, F. RANDOW: LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. In: *Molecular cell* 48 (2012), S. 329-342.
- [87] P. WILD, H. FARHAN, D.G. MCEWAN, S. WAGNER, V.V. ROGOV, N.R. BRADY, B. RICHTER, J. KORAC, O. WAIDMANN, C. CHOUDHARY: Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. In: *Science* 333 (2011), S. 228-233.
- [88] J. KORAC, V. SCHAEFFER, I. KOVACEVIC, A.M. CLEMENT, B. JUNGBLUT, C. BEHL, J. TERZIC, I. DIKIC: Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. In: *Journal of Cell Science* 126 (2013), S. 580-592.
- [89] Y. XIN, L. YU, Z. CHEN, L. ZHENG, Q. FU, J. JIANG, P. ZHANG, R. GONG, S. ZHAO: Cloning, Expression Patterns, and Chromosome Localization of Three Human and Two Mouse Homologues of GABA_A Receptor-Associated Protein. In: *Genomics* 74 (2001), S. 408-413.
- [90] T. KANAZAWA, I. TANEIKE, R. AKAISHI, F. YOSHIZAWA, N. FURUYA, S. FUJIMURA, M. KADOWAKI: Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), S. 8452-8459.
- [91] C.M. SCHWORER, G.E. MORTIMORE: Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (1979), S. 3169-3173.
- [92] M. OSAKI, M.A. OSHIMURA, H. ITO: PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. In: *Apoptosis* 9 (2004), S. 667-676.
- [93] E.J. MCMANUS, D.R. ALESSI: TSC1–TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. In: *Nature cell biology* 4 (2002), S. E214-E216.
- [94] P. CODOGNO, A.J. MEIJER: Signaling Pathways in Mammalian Autophagy. In: *Eurekah Bioscience* 1 (2005), S. 69-80.
- [95] M.C. TOWLER, D.G. HARDIE: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. In: *Circulation research* 100 (2007), S. 328-341.
- [96] S. GROZINSKY-GLASBERG, I. SHIMON, M. KORBONITS, A.B. GROSSMAN: Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms. In: *Endocrine-related cancer* 15 (2008), S. 701-720.
- [97] S. WULLSCHLEGER, R. LOEWITH, M.N. HALL: TOR signaling in growth and metabolism. In: *Cell* 124 (2006), S. 471-484.
- [98] D.-H. KIM, D.D. SARBASSOV, S.M. ALI, J.E. KING, R.R. LATEK, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST, D.M. SABATINI: mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. In: *Cell* 110 (2002), S. 163-175.
- [99] C.H. JUNG, C.B. JUN, S.-H. RO, Y.-M. KIM, N.M. OTTO, J. CAO, M. KUNDU, D.-H. KIM: ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. In: *Molecular Biology of the Cell* 20 (2009), S. 1992-2003.
- [100] A. SURYAWAN, J. ESCOBAR, J.W. FRANK, H.V. NGUYEN, T.A. DAVIS: Developmental regulation of the activation of signaling components leading to translation initiation in skeletal muscle of

- neonatal pigs. In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291 (2006), S. E849-E859.
- [101] K. INOKI, T. ZHU, K.-L. GUAN: TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. In: *Cell* 115 (2003), S. 577-590.
- [102] W.A. WILSON, S.A. HAWLEY, D.G. HARDIE: Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP: ATP ratio. In: *Current Biology* 6 (1996), S. 1426-1434.
- [103] D.M. GWINN, D.B. SHACKELFORD, D.F. EGAN, M.M. MIHAYLOVA, A. MERY, D.S. VASQUEZ, B.E. TURK, R.J. SHAW: AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. In: *Molecular cell* 30 (2008), S. 214-226.
- [104] D.G. HARDIE: Why starving cells eat themselves. In: *Science* 331 (2011), S. 410-411.
- [105] B. XIAO, R. HEATH, P. SAIU, F.C. LEIPER, P. LEONE, C. JING, P.A. WALKER, L. HAIRE, J.F. ECCLESTON, C.T. DAVIS: Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. In: *Nature* 449 (2007), S. 496-500.
- [106] D.F. EGAN, D.B. SHACKELFORD, M.M. MIHAYLOVA, S. GELINO, R.A. KOHNZ, W. MAIR, D.S. VASQUEZ, A. JOSHI, D.M. GWINN, R. TAYLOR: Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. In: *Science* 331 (2011), S. 456-461.
- [107] C. BEHRENDTS, M.E. SOWA, S.P. GYGI, J.W. HARPER: Network organization of the human autophagy system. In: *Nature* 466 (2010), S. 68-76.
- [108] A.M. MARTELLI, C. EVANGELISTI, F. CHIARINI, J.A. MCCUBREY: The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. In: *Oncotarget* 1 (2010), S. 89.
- [109] J.M. BERG, J.L. TYMOCZKO: *Stryer Biochemie*. Spektrum, 2012. - ISBN 3827429889
- [110] P.P. PICCALUGA, A. GAZZOLA, C. MANNU, C. AGOSTINELLI, F. BACCI, E. SABATTINI, C. SAGRAMOSO, R. PIVA, F. RONCOLATO, G. INGHIRAMI: Pathobiology of anaplastic large cell lymphoma. In: *Advances in hematology 2010* (2011).
- [111] W.H. CHAPPELL, L.S. STEELMAN, J.M. LONG, R.C. KEMPF, S.L. ABRAMS, R.A. FRANKLIN, J. BÄSECKE, F. STIVALA, M. DONIA, P. FAGONE: Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. In: *Oncotarget* 2 (2011), S. 135.
- [112] Y. XU, Y. XING, Y. CHEN, Y. CHAO, Z. LIN, E. FAN, J.W. YU, S. STRACK, P.D. JEFFREY, Y. SHI: Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. In: *Cell* 127 (2006), S. 1239-1251.
- [113] V. JANSSENS, J. GORIS: Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. In: *Biochem J* 353 (2001), S. 417-439.
- [114] C. KAMIBAYASHI, R. ESTES, R.L. LICKTEIG, S.-I. YANG, C. CRAFT, M.C. MUMBY: Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), S. 20139-20148.
- [115] P. AGOSTINIS, R. DERUA, S. SARNO, J. GORIS, W. MERLEVEDE: Specificity of the polycation-stimulated (type-2A) and ATP, Mg-dependent (type-1) protein phosphatases toward substrates phosphorylated by P34cdc2 kinase. In: *European journal of biochemistry* 205 (1992), S. 241-248.
- [116] P. AGOSTINIS, J. GORIS, E. WAELKENS, L.A. PINNA, F. MARCHIORI, W. MERLEVEDE: Dephosphorylation of phosphoproteins and synthetic phosphopeptides. Study of the specificity of the polycation-stimulated and MgATP-dependent phosphorylase phosphatases. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), S. 1060-1064.
- [117] J. ARINO, C.W. WOON, D.L. BRAUTIGAN, T.B. MILLER, G.L. JOHNSON: Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isoforms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (1988), S. 4252-4256.
- [118] P.T. COHEN, N.D. BREWIS, V. HUGHES, D.J. MANN: Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. In: *FEBS letters* 268 (1990), S. 355-359.

- [119] B.A. HEMMINGS, C. ADAMS-PEARSON, F. MAURER, P. MUELLER, J. GORIS, W. MERLEVEDE, J. HOFSTEENGE, S.R. STONE: . alpha.-And. beta.-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 3166-3173.
- [120] T.A. MILLWARD, S. ZOLNIEROWICZ, B.A. HEMMINGS: Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. In: *Trends in biochemical sciences* 24 (1999), S. 186-191.
- [121] M. ANDJELKOVIĆ, T. JAKUBOWICZ, P. CRON, X.-F. MING, J.-W. HAN, B.A. HEMMINGS: Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), S. 5699-5704.
- [122] J.-K. HÉRICHÉ, F. LEBRIN, T. RABILLOUD, D. LEROY, E.M. CHAMBAZ, Y. GOLDBERG: Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α . In: *Science* 276 (1997), S. 952-955.
- [123] V. VOGELBERG-RAGAGLIA, T. SCHUCK, J.Q. TROJANOWSKI, V.M.-Y. LEE: PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. In: *Experimental Neurology* 168 (2001), S. 402-412.
- [124] V. JANSSENS, J. GORIS, C. VAN HOOF: PP2A: the expected tumor suppressor. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (2005), S. 34-41.
- [125] P.A. STECK, M.A. PERSHOUSE, S.A. JASSER, W.A. YUNG, H. LIN, A.H. LIGON, L.A. LANGFORD, M.L. BAUMGARD, T. HATTIER, T. DAVIS: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23. 3 that is mutated in multiple advanced cancers. In: *Nature genetics* 15 (1997), S. 356-362.
- [126] J. LI, C. YEN, D. LIAW, K. PODSYPANINA, S. BOSE, S.I. WANG, J. PUC, C. MILIARESI, L. RODGERS, R. MCCOMBIE: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. In: *Science* 275 (1997), S. 1943-1947.
- [127] E.C. CHU, A.S. TARNAWSKI: PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. In: *Medical Science Monitor* 10 (2004), S. RA235-RA235.
- [128] J.-O. LEE, H. YANG, M.-M. GEORGESCU, A. DI CRISTOFANO, T. MAEHAMA, Y. SHI, J.E. DIXON, P. PANDOLFI, N.P. PAVLETICH: Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. In: *Cell* 99 (1999), S. 323-334.
- [129] X. WU, K. HEPNER, S. CASTELINO-PRABHU, D. DO, M.B. KAYE, X.-J. YUAN, J. WOOD, C. ROSS, C.L. SAWYERS, Y.E. WHANG: Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), S. 4233-4238.
- [130] M.P. MYERS, J.P. STOLAROV, C. ENG, J. LI, S.I. WANG, M.H. WIGLER, R. PARSONS, N.K. TONKS: P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), S. 9052-9057.
- [131] T. MAEHAMA, J.E. DIXON: The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), S. 13375-13378.
- [132] D. LIAW, D.J. MARSH, J. LI, P.L. DAHIA, S.I. WANG, Z. ZHENG, S. BOSE, K.M. CALL, H.C. TSOU, M. PEACOCKE: Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. In: *Nature genetics* 16 (1997), S. 64-67.
- [133] C.-H. KWON, X. ZHU, J. ZHANG, L.L. KNOOP, R. THARP, R.J. SMEYNE, C.G. EBERHART, P.C. BURGER, S.J. BAKER: Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. In: *Nature genetics* 29 (2001), S. 404-411.
- [134] D.J. MARSH, V. COULON, K.L. LUNETTA, P. ROCCA-SERRA, P.L. DAHIA, Z. ZHENG, D. LIAW, S. CARON, B. DUBOUÉ, A.Y. LIN: Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. In: *Human Molecular Genetics* 7 (1998), S. 507-515.
- [135] N. CHANG, Y.H. EL-HAYEK, E. GOMEZ, Q. WAN: Phosphatase PTEN in neuronal injury and brain disorders. In: *Trends in neurosciences* 30 (2007), S. 581-586.
- [136] R. KIM, T. MAK: Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. In: *British journal of cancer* 94 (2006), S. 620-624.

- [137] N.K. TONKS, C. DILTZ, E. FISCHER: Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988), S. 6722-6730.
- [138] A. ALONSO, J. SASIN, N. BOTTINI, I. FRIEDBERG, I. FRIEDBERG, A. OSTERMAN, A. GODZIK, T. HUNTER, J. DIXON, T. MUSTELIN: Protein tyrosine phosphatases in the human genome. In: *Cell* 117 (2004), S. 699-711.
- [139] M. STUIBLE, K.M. DOODY, M.L. TREMBLAY: PTP1B and TC-PTP: regulators of transformation and tumorigenesis. In: *Cancer and Metastasis Reviews* 27 (2008), S. 215-230.
- [140] J.V. FRANGIONI, P.H. BEAHM, V. SHIFRIN, C.A. JOST, B.G. NEEL: The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. In: *Cell* 68 (1992), S. 545-560.
- [141] F. LIU, D.E. HILL, J. CHERNOFF: Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130Cas. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), S. 31290-31295.
- [142] J.V. FRANGIONI, A. ODA, M. SMITH, E.W. SALZMAN, B.G. NEEL: Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. In: *The EMBO journal* 12 (1993), S. 4843.
- [143] M.F. CICIRELLI, N.K. TONKS, C.D. DILTZ, J.E. WEI, E.H. FISCHER, E. KREBS: Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in *Xenopus* oocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (1990), S. 5514-5518.
- [144] B.L. SEELY, P.A. STAUBS, D.R. REICHAERT, P. BERHANU, K.L. MILARSKI, A.R. SALTIEL, J. KUSARI, J.M. OLEFSKY: Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. In: *Diabetes* 45 (1996), S. 1379-1385.
- [145] J.C. BYON, A.B. KUSARI, J. KUSARI: Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction. In: *Molecular and cellular biochemistry* 182 (1998), S. 101-108.
- [146] F.G. HAJ, B. MARKOVA, L.D. KLAMAN, F.D. BOHMER, B.G. NEEL: Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 739-744.
- [147] M. ELCHEBLY, P. PAYETTE, E. MICHALISZYN, W. CROMLISH, S. COLLINS, A.L. LOY, D. NORMANDIN, A. CHENG, J. HIMMS-HAGEN, C.-C. CHAN: Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. In: *Science* 283 (1999), S. 1544-1548.
- [148] L.D. KLAMAN, O. BOSS, O.D. PERONI, J.K. KIM, J.L. MARTINO, J.M. ZABOLOTNY, N. MOGHAL, M. LUBKIN, Y.-B. KIM, A.H. SHARPE: Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. In: *Molecular and cellular biology* 20 (2000), S. 5479-5489.
- [149] N.K. TONKS, S.K. MUTHUSWAMY: A brake becomes an accelerator: PTP1B—a new therapeutic target for breast cancer. In: *Cancer cell* 11 (2007), S. 214-216.
- [150] S. ZHU, J.D. BJORGE, D.J. FUJITA: PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. In: *Cancer research* 67 (2007), S. 10129-10137.
- [151] M. ADACHI, E.H. FISCHER, J. IHLE, K. IMAI, F. JIRIK, B. NEEL, T. PAWSON, S.-H. SHEN, M. THOMAS, A. ULLRICH: Mammalian SH2-containing protein tyrosine phosphatases. In: *Cell* 85 (1996).
- [152] B.G. NEEL, Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases, *Seminars in cell biology*, Elsevier, 1993, pp. 419-432.
- [153] G.-S. FENG, T. PAWSON: Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. In: *Trends in Genetics* 10 (1994), S. 54-58.
- [154] Y.M. AGAZIE, M.J. HAYMAN: Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. In: *Molecular and cellular biology* 23 (2003), S. 7875-7886.
- [155] W. LI, R. NISHIMURA, A. KASHISHIAN, A.G. BATZER, W. KIM, J.A. COOPER, J. SCHLESSINGER: A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. In: *Molecular and cellular biology* 14 (1994), S. 509-517.
- [156] H. MAEGAWA, M. HASEGAWA, S. SUGAI, T. OBATA, S. UGI, K. MORINO, K. EGAWA, T. FUJITA, T. SAKAMOTO, Y. NISHIO: Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), S. 30236-30243.

- [157] K. FUKUNAGA, T. NOGUCHI, H. TAKEDA, T. MATOZAKI, Y. HAYASHI, H. ITOH, M. KASUGA: Requirement for protein-tyrosine phosphatase SHP-2 in insulin-induced activation of c-Jun NH2-terminal kinase. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), S. 5208-5213.
- [158] K.L. MILARSKI, A.R. SALTIEL: Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), S. 21239-21243.
- [159] T. ARAKI, H. NAWA, B.G. NEEL: Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 41677-41684.
- [160] S.Q. ZHANG, W.G. TSIARAS, T. ARAKI, G. WEN, L. MINICHIELLO, R. KLEIN, B.G. NEEL: Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. In: *Molecular and cellular biology* 22 (2002), S. 4062-4072.
- [161] M. MOHI, B. NEEL: The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. In: *Current opinion in genetics & development* 17 (2007), S. 23-30.
- [162] M. TARTAGLIA, E.L. MEHLER, R. GOLDBERG, G. ZAMPINO, H.G. BRUNNER, H. KREMER, I. VAN DER BURGT, A.H. CROSBY, A. ION, S. JEFFERY: Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. In: *Nature genetics* 29 (2001), S. 465-468.
- [163] M. TARTAGLIA, B.D. GELB: Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. In: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6 (2005), S. 45-68.
- [164] M. TARTAGLIA, C.M. NIEMEYER, K.M. SHANNON, M.L. LOH: SHP-2 and myeloid malignancies. In: *Current opinion in hematology* 11 (2004), S. 44-50.
- [165] M. TARTAGLIA, C.M. NIEMEYER, A. FRAGALE, X. SONG, J. BUECHNER, A. JUNG, K. HÄHLEN, H. HASLE, J.D. LICHT, B.D. GELB: Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. In: *Nature genetics* 34 (2003), S. 148-150.
- [166] M.L. LOH, S. VATTIKUTI, S. SCHUBBERT, M.G. REYNOLDS, E. CARLSON, K.H. LIEUW, J.W. CHENG, C.M. LEE, D. STOKOE, J.M. BONIFAS: Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. In: *Blood* 103 (2004), S. 2325-2331.
- [167] H. ISHIHARA, B. MARTIN, D. BRAUTIGAN, H. KARAKI, H. OZAKI, Y. KATO, N. FUSEYANI, S. WATABE, K. HASHIMOTO, D. UEMURA: Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 159 (1989), S. 871-877.
- [168] J.A. GORDON: [41] Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. In: *Methods in enzymology* 201 (1991), S. 477-482.
- [169] G. HUYER, S. LIU, J. KELLY, J. MOFFAT, P. PAYETTE, B. KENNEDY, G. TSAPRILIS, M.J. GRESSER, C. RAMACHANDRAN: Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), S. 843-851.
- [170] B.I. POSNER, R. FAURE, J.W. BURGESS, A.P. BEVAN, D. LACHANCE, G. ZHANG-SUN, I.G. FANTUS, J.B. NG, D.A. HALL, B.S. LUM: Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), S. 4596-4604.
- [171] C. CUNCIC, S. DESMARAIS, N. DETICH, A.S. TRACEY, M.J. GRESSER, C. RAMACHANDRAN: Bis (N, N-dimethylhydroxamido) hydroxooxovanadate inhibition of protein tyrosine phosphatase activity in intact cells-Implications for protein tyrosine phosphatase inhibition. In: *Biochemical pharmacology* 58 (1999), S. 1859-1867.
- [172] C.E. HEYLIGER, A.G. TAHILIANI, J.H. MCNEILL: Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. In: *Science* 227 (1985), S. 1474-1477.
- [173] A.C. SCHMID, R.D. BYRNE, R. VILAR, R. WOSCHOLSKI: Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. In: *FEBS letters* 566 (2004), S. 35-38.
- [174] Y. KATO, N. FUSEYANI, S. MATSUNAGA, K. HASHIMOTO, S. FUJITA, T. FURUYA: Bioactive marine metabolites. Part 16. Calyculin A. A novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*. In: *Journal of the American Chemical Society* 108 (1986), S. 2780-2781.
- [175] M. SUGANUMA, H. FUJIKI, H. FURUYA-SUGURI, S. YOSHIZAWA, S. YASUMOTO, Y. KATO, N. FUSEYANI, T. SUGIMURA: Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. In: *Cancer research* 50 (1990), S. 3521-3525.

- [176] L. STRYER, *Biochemie*, Springer, 1987, pp. 349-370.
- [177] Y.A. HANNUN, L.M. OBEID: Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. In: *Trends in biochemical sciences* 20 (1995), S. 73-77.
- [178] L.M. OBEID, C.M. LINARDIC, L.A. KAROLAK, Y.A. HANNUN: Programmed cell death induced by ceramide. In: *Science* 259 (1993), S. 1769-1771.
- [179] A. HAIMOVITZ-FRIEDMAN, C.-C. KAN, D. EHLEITER, R.S. PERSAUD, M. MCLOUGHLIN, Z. FUKS, R.N. KOLESNICK: Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. In: *The Journal of Experimental Medicine* 180 (1994), S. 525-535.
- [180] R. DOBROWSKY, C. KAMIBAYASHI, M. MUMBY, Y. HANNUN: Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. In: *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993), S. 15523-15530.
- [181] M. ELLIOTT, N. JANES, C. POTTER: The future of pyrethroids in insect control. In: *Annual Review of Entomology* 23 (1978), S. 443-469.
- [182] R. NISAR: Common pesticides and the development of Parkinson's disease. In: (2011).
- [183] S. AGRAWAL, A. SINGH, P. TRIPATHI, M. MISHRA, P.K. SINGH, M.P. SINGH: Cypermethrin-induced nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration alters the mitochondrial function: a proteomics study. In: *Mol Neurobiol* (2014), S. 1-18.
- [184] P. JADIYA, A. NAZIR: Environmental toxicants as extrinsic epigenetic factors for Parkinsonism: Studies employing transgenic *C. elegans* model. In: *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 11 (2012), S. 976-983.
- [185] S. SWANSON, T. BORN, L.D. ZYDOWSKY, H. CHO, H.Y. CHANG, C.T. WALSH, F. RUSNAK: Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992), S. 3741-3745.
- [186] F. RUSNAK, P. MERTZ: Calcineurin: form and function. In: *Physiological reviews* 80 (2000), S. 1483-1521.
- [187] M. IMOTO, H. KAKEYA, T. SAWA, C. HAYASHI, M. HAMADA, T. TAKEUCHI, K. UMEZAWA: Dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. I. Taxonomy, isolation, and characterization. In: *The Journal of antibiotics* 46 (1993), S. 1342.
- [188] T. WATANABE, T. SUZUKI, Y. UMEZAWA, T. TAKEUCHI, M. OTSUKA, K. UMEZAWA: Structure-activity relationship and rational design of 3, 4-dephostatin derivatives as protein tyrosine phosphatase inhibitors. In: *Tetrahedron* 56 (2000), S. 741-752.
- [189] T. SUZUKI, A. HIROKI, T. WATANABE, T. YAMASHITA, I. TAKEI, K. UMEZAWA: Potentiation of insulin-related signal transduction by a novel protein-tyrosine phosphatase inhibitor, Et-3, 4-dephostatin, on cultured 3T3-L1 adipocytes. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), S. 27511-27518.
- [190] J. TUNAC, B. GRAHAM, W. DOBSON: Novel antitumor agents CI-920, PD 113,270 and PD 113,271. I. Taxonomy, fermentation and biological properties. In: *The Journal of antibiotics* 36 (1983), S. 1595-1600.
- [191] A.H. WALSH, A. CHENG, R.E. HONKANEN: Fostriecin, an antitumor antibiotic with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases types 1 (PP1) and 2A (PP2A), is highly selective for PP2A. In: *FEBS letters* 416 (1997), S. 230-234.
- [192] G. WORTMANN, R.S. MILLER, C. OSTER, J. JACKSON, N. ARONSON: A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10-or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. In: *Clinical infectious diseases* 35 (2002), S. 261-267.
- [193] M.K. PATHAK, T. YI: Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. In: *The Journal of Immunology* 167 (2001), S. 3391-3397.
- [194] K. TACHIBANA, P.J. SCHEUER, Y. TSUKITANI, H. KIKUCHI, D. VAN ENGEN, J. CLARDY, Y. GOPICHAND, F.J. SCHMITZ: Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. In: *Journal of the American Chemical Society* 103 (1981), S. 2469-2471.

- [195] Y. MURAKAMI, Y. OSHIMA, T. YASUMOTO: Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. In: *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)* (1982).
- [196] J. HESCHELER, G. MIESKES, J. RÜEGG, A. TAKAI, W. TRAUTWEIN: Effects of a protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, on membrane currents of isolated guinea-pig cardiac myocytes. In: *Pflügers Archiv* 412 (1988), S. 248-252.
- [197] C. BIALOJAN, A. TAKAI: Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. In: *Biochem. J* 256 (1988), S. 283-290.
- [198] T. HAYSTEAD, A. SIM, D. CARLING, R. HONNOR, Y. TSUKITANI, P. COHEN, D. HARDIE: Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. In: *Nature* 337 (1989), S. 78.
- [199] J. XIE, C.T. SETO: A two stage click-based library of protein tyrosine phosphatase inhibitors. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 15 (2007), S. 458-473.
- [200] D. BAE, T.C. CAMILLI, N.-T. HA, S. CERYAK: Enhanced clonogenic survival induced by protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibition after Cr (VI) exposure is mediated by c-Raf and Ras activity. In: *Cellular signalling* 21 (2009), S. 727-736.
- [201] W. LI, J. JU, S.R. RAJSKI, H. OSADA, B. SHEN: Characterization of the tautomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces spiroverticillatus* unveiling new insights into dialkylmaleic anhydride and polyketide biosynthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008), S. 28607-28617.
- [202] C. MACKINTOSH, S. KLUMPP: Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. In: *FEBS Lett* 277 (1990), S. 137-140.
- [203] S. MITSUHASHI, N. MATSUURA, M. UBUKATA, H. OIKAWA, H. SHIMA, K. KIKUCHI: Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287 (2001), S. 328-331.
- [204] S. MITSUHASHI, H. SHIMA, N. TANUMA, N. MATSUURA, M. TAKEKAWA, T. URANO, T. KATAOKA, M. UBUKATA, K. KIKUCHI: Usage of tautomycetin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in vivo. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 82-88.
- [205] S. LIU, Z. YU, X. YU, S.-X. HUANG, Y. LUO, L. WU, W. SHEN, Z. YANG, L. WANG, A.M. GUNAWAN: SHP2 is a target of the immunosuppressant tautomycetin. In: *Chemistry & biology* 18 (2011), S. 101-110.
- [206] D. HAN, Y. JEONG, Y. WEE, A. LEE, H. LEE, J. HA, S. LEE, S. KIM, Tautomycetin as a novel immunosuppressant in transplantation, *Transplantation proceedings*, Elsevier, 2003, p. 547.
- [207] S. SCHMITZ: *Der Experimentator: Zellkultur*. Springer, 2011. - ISBN 3827425727
- [208] F.M. MENZIES, K. MOREAU, C. PURI, M. RENNA, D.C. RUBINSZTEIN, *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [209] A. FIRE, S. XU, M. MONTGOMERY, S. KOSTAS, S. DRIVER, C. MELLO: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (1998), S. 806-811.
- [210] E. BERNSTEIN, A.A. CAUDY, S.M. HAMMOND, G.J. HANNON: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In: *Nature* 409 (2001), S. 363-366.
- [211] J. MARTINEZ, A. PATKANIOWSKA, H. URLAUB, R. LÜHRMANN, T. TUSCHL: Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. In: *Cell* 110 (2002), S. 563-574.
- [212] S.M. HAMMOND, E. BERNSTEIN, D. BEACH, G.J. HANNON: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. In: *Nature* 404 (2000), S. 293-296.
- [213] J. MARTINEZ, T. TUSCHL: RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. In: *Genes & development* 18 (2004), S. 975-980.
- [214] M. VOLGGER: *Lichtmikroskopie-Theorie und Anwendung*. In: *Skriptum, Universität Wien, Wien* (2008).
- [215] U.K. LAEMMLI: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680-685.

- [216] N. MIZUSHIMA, T. YOSHIMORI, B. LEVINE: Methods in Mammalian Autophagy Research. In: *Cell* 140 (2010), S. 313-326.
- [217] D. VOET, J.G. VOET, C.W. PRATT, A. BECK-SICKINGER, U. HAHN: *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley VCH: Weinheim, 2010. - ISBN 3527326677
- [218] S.J. CHERRA, S.M. KULICH, G. UECHI, M. BALASUBRAMANI, J. MOUNTZOURIS, B.W. DAY, C.T. CHU: Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. In: *The Journal of cell biology* 190 (2010), S. 533-539.
- [219] H. JIANG, D. CHENG, W. LIU, J. PENG, J. FENG: Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395 (2010), S. 471-476.
- [220] D.T. CHAO, S.J. KORSMEYER: BCL-2 family: regulators of cell death. In: *Annual review of immunology* 16 (1998), S. 395-419.
- [221] S. PATTINGRE, A. TASSA, X. QU, R. GARUTI, X.H. LIANG, N. MIZUSHIMA, M. PACKER, M.D. SCHNEIDER, B. LEVINE: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. In: *Cell* 122 (2005), S. 927-939.
- [222] Y. WEI, S. PATTINGRE, S. SINHA, M. BASSIK, B. LEVINE: JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. In: *Molecular cell* 30 (2008), S. 678-688.
- [223] S. PATTINGRE, C. BAUVY, S. CARPENTIER, T. LEVADE, B. LEVINE, P. CODOGNO: Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), S. 2719-2728.
- [224] P.P. RUVOLO, X. DENG, T. ITO, B.K. CARR, W.S. MAY: Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), S. 20296-20300.
- [225] X. DENG, F. GAO, W.S. MAY: Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. In: *Blood* 113 (2009), S. 422-428.
- [226] P. MA, M. SCHWARTEN, L. SCHNEIDER, A. BOESKE, N. HENKE, D. LISAK, S. WEBER, J. MOHRLÜDER, M. STOLDT, B. STRODEL: Interaction of Bcl-2 with the autophagy-related GABAA receptor-associated protein (GABARAP): biophysical characterization and functional implications. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2013), S. 37204-37215.
- [227] J. KIM, M. KUNDU, B. VIOLLET, K.-L. GUAN: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. In: *Nat Cell Biol* 13 (2011), S. 132-141.
- [228] J. KIM, K.-L. GUAN: Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: Roles of mTORC1 and AMPK. In: *Cell Cycle* 10 (2011), S. 1337-1338.
- [229] D. EGAN, J. KIM, R.J. SHAW, K.-L. GUAN: The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. In: *Autophagy* 7 (2011).
- [230] E.A. DUNLOP, D.K. HUNT, H.A. ACOSTA-JAQUEZ, D.C. FINGAR, A.R. TEE: ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. In: *Autophagy* 7 (2011), S. 737-747.
- [231] I. VERGNE, E. ROBERTS, R.A. ELMAOUED, V. TOSCH, M.A. DELGADO, T. PROIKAS-CEZANNE, J. LAPORTE, V. DERETIC: Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. In: *EMBO J* 28 (2009), S. 2244-2258.
- [232] D.G. McEWAN, I. DIKIC: The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. In: *Trends in Cell Biology* 21 (2011), S. 195-201.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AF488	Alexa Fluor 488
AK	Antikörper
Ambra1	Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
An1	Anodenpuffer 1
An2	Anodenpuffer 2
APS	Ammoniumpersulfat
Atg	Autophagy-related protein
ATP	Adenosintriphosphat
BafA1	Bafilomycin A1
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
bpV(OH)pic	Dikalium-bisperoxo-(5-hydroxypyridin-2-carboxyl)-oxovanadat
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk1/2	Extracellular-signal regulated kinase 1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FIP200	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD
FKS	fetales Kälberserum
GABA _A - Rezeptor	γ -Aminobuttersäure Typ A-Rezeptor
GABARAP	γ -aminobutyrate type A receptor-associated protein
GABARAPL1	γ -aminobutyrate type A receptor-associated protein-like 1
GATE16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa
Gec1	Glandular epithelial cell protein 1
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution (Hank's gepufferte Salzlösung)
HEK293	Human embryonic kidney 293

Abkürzung	Bedeutung
HeLa	HenriettaLarks
HepG2	Hepatocellular carcinoma G2
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Hsc70	Heat shock cognate of 70 kDa
IC50	Konzentration, bei der 50% der maximalen Wirkung erreicht werden
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulin receptor substrate
JNK1	c-Jun N-terminal protein kinase 1
Lamp-2A	Lysosome-associated membrane protein type 2A
MAP1LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3
MEK	Mitogen-activated protein kinase/Extracellular-signal regulated Kinase
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Maus
mTOR	mammalian target of Rapamycin
mTORC1	mammalian target of Rapamycin Komplex 1
N2A	Neuro 2A
NaCl	Natriumchlorid
NDP52	Antigen nuclear dot 52 kDa protein
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
p.a.	pro analysi, für analytische Versuche
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PDZ	post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor and zonula occludens-1 protein
PE	Phosphatidylethanolamin
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB/Akt	Proteinkinase B
PP2A	Proteinphosphatase 2 A
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
PTP	Proteintyrosin-Phosphatase
PTP1B	Proteintyrosin-Phosphatase 1B
PTP-Inhibitor II	2-Bromo-4'-methoxyacetophenon
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	Rat fibrosarcoma
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma
rb	rabbit (Kaninchen)
Rheb	Ras homolog enriched in brain

Abkürzung	Bedeutung
RISC	RNA-induced silencing complex
RNS	Ribonukleinsäure
RNSi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RU	Relative units (Relative Einheiten)
Rubicon	RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin-1 interacting protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2	Src-Homologie 2
SH3	Src-Homologie 3
SHP1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SHP2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
siRNS	small interfering (kleine, interferierende) Ribonukleinsäure
SNARE	soluble NSF attachment receptor
SQSTM1	Sequestosom1
STED	stimulated emission depletion
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween 20
TEE	Tris-Essigsäure-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsc	Tuberous sclerosis protein
ULK1/2	Unc-51-like kinase 1/2
UVRAG	UV irradiation resistance-associated gene
v/v	Volumen pro Volumen
Vps34	Vacuolar protein sorting 34
w/v	Masse pro Volumen

8.2 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dieter Willbold für die Überlassung des spannenden Themas, die Gelegenheit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe, für die Betreuung und konstruktive Kritik an meiner Arbeit, sowie die exzellente Laborausstattung.

Ich danke meinem Betreuer PD Dr. Oliver Weiergräber dafür, dass er mir stets mit gutem Rat und Tipps zur Seite stand, er mich immer motiviert hat und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Durch seine konstruktiven Vorschläge, Diskussionen mit ihm und seinen Überblick habe ich das Ziel nie aus den Augen verloren.

Dr. Jeannine Mohrlüder danke ich ebenfalls für die konstruktive Kritik, Tipps und Vorschläge bei der Laborarbeit und das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Ich danke Dr. Alexandra Boeske für die Einführung in die Arbeit in der Zellkultur, die steten Tipps und Diskussionen zu Umgang und Experimenten mit Zellkulturen.

Ich danke meinen Bürokollegen Claas Roes, Christina Winzösch und Julia Post dafür, dass sie während meiner Promotion immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatten. Es war toll mit Euch!

Ich danke allen meinen ehemaligen und noch-Mitdoktoranden, die ich auf dem Weg zum Doktor kennenlernen durfte. Ihr seid großartig! Denen, die ihre Promotion noch nicht abgeschlossen haben wünsche ich viel Erfolg! (Allen anderen auch)

Ich möchte auch dem gesamten Laborteam (TAs und Spülkräfte) für die Hilfe, Tipps, das Herstellen von Lösungen, Puffern, etc., Sauberhalten des Labors, Instandhaltung und vieles mehr danken. Alle Doktoranden können sich glücklich schätzen euch zu haben! Danke!

Ganz besonders danke ich allen Mitgliedern meiner Familie, die mich immer unterstützt haben und ohne die diese Arbeit mit Sicherheit nicht zu Stande gekommen wäre. Ohne Euch alle wäre ich nicht das, was ich bin! Ein besonderes Dankeschön gilt außerdem meiner Mutter, die Teile der Arbeit Korrektur gelesen hat.

Ich möchte insgesamt allen danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

8.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift