Osmosensitivität der Autophagie in der Hefe Saccharomyces cerevisiae -Parallelen und Unterschiede zur Säugerleber

Inaugural-Dissertation

zur

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

> vorgelegt von Tanja Prick aus Viersen

Oktober 2006

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie (Direktor: Prof. Dr. med. D. Häussinger) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. med. Stephan vom Dahl

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2006

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht ...

... als Originalpublikation:

- T. Prick, M. Thumm, K. Köhrer, D. Häussinger and S. vom Dahl In yeast, loss of Hog1 leads to osmosensitivity of autophagy. Biochem. J. (2006) 394; 153-161
- T. Prick, M. Thumm, D. Häussinger and S. vom Dahl Deletion of *HOG1* leads to osmosensitivity in starvation-induced, but not rapamycindependent Atg8 degradation and proteolysis. Autophagy 2006; 2(3); 241-243
- T. Prick, I. Flachs, M. Thumm, D. Häussinger and S. vom Dahl Osmosensitivity of starvation-induced autophagy in *PBS2*-deleted yeast cells. (submitted)

... als Poster:

- T. Prick, M. Thumm, D. Häussinger, S. vom Dahl Osmoregulation der Autophagozytose in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae.
 Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Januar 2003 in Berlin Z. Gastroenterol. 2003; 41, 115
- T. Prick, M. Thumm, K. Köhrer, D. Häussinger, S. vom Dahl Osmosensitivity of autophagocytosis in *S. cerevisiae*.
 55. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), April 2004 in Mosbach
- T. Prick, M. Thumm, I. Flachs, K. Köhrer, D. Häussinger, S. vom Dahl Osmosensitivität der Autophagozytose in Hefe.
 21. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Januar 2005 in Ulm
 Z. Gastroenterol. 2005; 43, 80

4. T. Prick, M. Thumm, I. Flachs, D. Häussinger, S. vom Dahl Regulation der Autophagie - Parallelen zwischen Leber und Hefe.
14. Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, April 2005 in Bochum Gewinner des Posterpreises für Grundlagenforschung

Gewinner eines Reisestipendiums

- T. Prick, M. Thumm, D. Häussinger, S. vom Dahl Osmosensing and osmosignalling of autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Gordon Research Conference "Autophagy in Stress, Development and Disease", April 2005 in Barga, Italien
- T. Prick, I. Flachs, M. Thumm, K. Köhrer, D. Häussinger, S. vom Dahl Regulation der Autophagie - Parallelen zwischen Leber und Hefe.
 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), September 2005 in Köln Z. Gastroenterol. 2005; 43, 912
- T. Prick, M. Thumm, I. Flachs, K. Köhrer, D. Häussinger, S. vom Dahl Regulation der Autophagie - Parallelen zwischen Leber und Hefe.
 22. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Januar 2006 in Leipzig
 Z. Gastroenterol. 2006; 44, 101

... als Vortrag:

 T. Prick, D. Häussinger, M. Thumm, K. Köhrer, S. vom Dahl Vesikulärer Transport - Lektionen aus der Hefe.
 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Arbeitsgruppensitzung 13 "Transportmechanismen in der Leber und im Darm", September 2003 in Nürnberg

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	9
1.1	Grundlegende Mechanismen der autophagischen Proteolyse	10
1.2	Die Autophagie in der Hefe Saccharomyces cerevisiae	12
1.2.1	Molekulare Komponenten	12
1.2.2	Die Autophagie und der Cvt-Weg	14
1.2.3	Die Inaktivierung von Tor führt zur Induktion der Autophagie	14
1.2.4	Segregation	16
1.2.4.1	Das Atg12-Atg5-Konjugationssystem initiiert die Segregation	16
1.2.4.2	Die Membranrekrutierung von Atg8 ist essentiell für die Segregation	17
1.3	Osmotischer Stress in Hefe als Sonderform des "environmental stress"	20
1.3.1	Osmoregulation	21
1.4	MAPK-Signalwege in Saccharomyes cerevisiae	24
1.4.1	Der HOG1-Signaltransduktionsweg in der Hefe Saccharomyces cerevisiae	25
1.5	Die autophagische Proteolyse in der Säugerleber	27
1.6	Klinische Bedeutung der Autophagie	29
П	Fragestellung	31
	• •	
111	Material und Methoden	33
III 3.1	Material und Methoden	33 33
III 3.1 3.1.1	Material und Methoden Material Verwendete Stämme	33 33 33
III 3.1 3.1.1 3.1.2	Material und Methoden	33 33 33 34
III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide	33 33 33 34 35
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien	33 33 34 35 36
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen	33 33 34 35 36 37
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen Medien für Escherichia coli-Kulturen	33 33 34 36 36 37 38
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen Medien für Escherichia coli-Kulturen Antikörper	33 33 34 36 36 37 38 39
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen Medien für Escherichia coli-Kulturen Antikörper Enzyme	33 33 34 35 36 37 38 39 39
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen Medien für Escherichia coli-Kulturen Antikörper Enzyme Chemikalien	33 33 34 35 36 37 38 39 39 39 39
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen Medien für Escherichia coli-Kulturen Antikörper Enzyme Chemikalien Kits	33 33 34 35 36 37 39 39 39 39 39 39 39 39
 III 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10 3.1.11 	Material und Methoden Material Verwendete Stämme Plasmide Oligonukleotide Wachstumsmedien Medien für Hefekulturen Medien für Escherichia coli-Kulturen Antikörper Enzyme Chemikalien Kits Radioaktive Substanzen	33 33 34 35 36 37 39 39 39 39 39 39 39 39 39 39 39 39 39 39

3.2	Methoden	_42
3.2.1	Zellkultur	_42
3.2.1.1	Sterilisation von Lösungen und Gegenständen	_42
3.2.1.2	Allgemeine Wachstumsbedingungen	_42
3.2.1.3	Dauerkulturen	_42
3.2.1.4	Wachstumsbedingungen von Hefe	.42
3.2.1.5	Zelldichte-Messung	_43
3.2.1.6	Wachstumsbedingungen von Escherichia coli	.43
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	_44
3.2.2.1	Vorbehandlung von Glasperlen (Neutralisation)	_44
3.2.2.2	Isolierung von DNA	_44
3.2.2.3	Transformation	_45
3.2.2.4	Restriktionsverdau von DNA	46
3.2.2.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	_47
3.2.2.6	Genaustausch durch homologe Rekombination	_47
3.2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	_48
3.2.2.8	Reinigung von PCR-Produkten	_50
3.2.2.9	Bestimmung der DNA-Konzentration	50
3.2.2.10	Southern-Blot-Analyse	50
3.2.2.11	Konzentrationsbestimmung von DNA	.52
3.2.3	Zellbiologische und biochemische Methoden	<u>.</u> 53
3.2.3.1	Vesikeltest (Test auf Akkumulation autophagischer Vesikel)	_53
3.2.3.2	Untersuchung auf Vitalität bei anisoosmotischer Inkubation	<u>.</u> 53
3.2.3.3	Kernfärbung mit Methylenblau (Vitalfärbung von Hefezellen)	54
3.2.3.4	Osmosensitivitätsassay	_54
3.2.4	Proteinchemische Methoden	54
3.2.4.1	Herstellung von Proteinrohextrakten mittels alkalischer Lyse von Hefezellen	54
3.2.4.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	_55
3.2.4.3	Western-Blot	_56
3.2.4.4	Bestimmung der GFP-Atg8-Degradation	_58
3.2.4.5	Bestimmung des Lipidierungsstatus von Atg8	.59
3.2.4.6	Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von Atg13	_59
3.2.4.7	Bestimmung der Proteolyserate	60
3.2.4.8	Mikroskopische Untersuchungen	62
3.2.4.9	Statistische Verfahren und graphische Darstellung	62

IV	Ergebnisse	63
4.1	Die Deletion von HOG1 führt zu Osmosensitivität in Hefe	63
4.1.1	Die Reifung der Aminopeptidase I ist in <i>hog1</i> ∆-Zellen normal	64
4.1.2	Die Bildung autophagischer Vesikel wird durch N-Mangel induziert	66
4.1.3	Bei osmotischem Stress weist die Vakuole von <i>hog1</i> ∆-Zellen vermindert	
	GFP-Atg8 auf	67
4.1.4	Die Vitalität von <i>hog1</i> ∆-Zellen ist nach Induktion der Autophagie durch	
	N-Mangel bei anisoosmotischer Umgebungsosmolarität bis	
	500 mosmol/L nicht beeinträchtigt	_68
4.1.5	Während osmotischem Stress ist die Degradation von GFP-Atg8 in	
	<i>hog1</i> ∆-Zellen verringert	69
4.1.6	In hog1 ^Δ -Zellen wird die Proteolyserate durch die extrazelluläre Osmolarität	
	moduliert	_74
4.2	Der PBS2-Disruptionsstamm	76
4.2.1	Bei osmotischem Stress weist die Vakuole von <i>pbs2</i> ∆-Zellen vermindert	
	GFP-Atg8 auf	_76
4.2.2	Osmosensitivität der Autophagie in <i>pbs2</i> ∆-Zellen	_77
4.3	Die Disruption von SHO1 und SLN1 in wildtypischen Hefezellen	78
4.3.1	Die Deletion von SHO1 führt nicht zur Osmosensitivität der Hefe	78
4.4	Untersuchungen zu Mechanismen der Osmosensitivität der Autophagie in	
	<i>hog1</i> ∆-Zellen	79
4.4.1	Reversibilität der Autophagie in <i>hog1</i> ∆-Zellen	79
4.4.2	Untersuchungen zur Lokalisation von Atg8 und der präautophagosomalen	
	Struktur	_81
4.4.3	In <i>hog1</i> ∆-Zellen wird weder die Lipidierung von Atg8 noch der	
	Phosphorylierungsstatus von Atg13 durch osmotischen Stress beeinflusst	84
4.4.4	Die GFP-Atg8-Degradation in WT-Zellen wird durch Zugabe von	
	p38 ^{MAPK} -Inhibitoren nicht beeinflusst	88
4.5	Die Rapamycin-induzierte Autophagie weist keine Osmosensitivität auf	90
4.5.1	In <i>hog1</i> ∆-Zellen wird die Rapamycin-vermittelte Proteolyse nicht durch die	
	extrazelluläre Osmolarität moduliert	.92
4.5.2	Ein quantitativer Vergleich der GFP-Atg8-Degradation bei Induktion	
	der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium im Vergleich	
	zur Induktion durch Zugabe von Rapamycin	95

4.6	Ein Vergleich von Autophagiemechanismen in Hefe und Leber	<u>97 </u>
4.6.1	Die Hunger-induzierte Autophagie wird in der Hefe - ebenso wie in	
	der Leber - durch Phenylalanin und NH₄Cl gehemmt	<u>97</u>
4.6.2	In Hefe wirkt Phenylalanin und NH₄Cl hemmend auf die	
	Hunger-induzierte Proteolyse	<u>98</u>
4.6.3	In Hefe sind Phenylalanin und NH₄Cl ohne Wirkung auf die	
	Rapamycin-induzierte GFP-Atg8-Degradation	99
4.6.4	Phenylalanin und NH₄Cl zeigen keinen Einfluss auf die Rapamycin-	
	induzierte Proteolyse	100
v	Diskussion	<u>101</u>
5.1	In der Hefe Saccharomyces cerevisiae führt die Deletion von HOG1	
	zur Osmosensitivität der Autophagie während osmotischem Stress	101
5.1.1	Wie wird die Osmosensitivität der Autophagie in <i>hog1</i> ∆-Zellen	
	während osmotischem Stress reguliert?	105
5.2	Die Deletion von HOG1 führt zur Osmosensitivität der Hunger-	
	induzierten, aber nicht der Rapamycin-induzierten Atg8-Degradation	
	und Proteolyse	110
5.3	Regulation der Proteolyse in Leber und Hefe - Parallelen und	
	Unterschiede	113
5.3.1	Analogien der autophagischen Proteolyse zwischen Leber und Hefe	117
VI	Zusammenfassung	123
VII	Abstract	125
VIII	Literatur	<u></u> 127
IX	Abkürzungen	143
x	Danksagung	147
XI	Lebenslauf	149

Der Begriff Autophagie bedeutet Selbstverdau und bezeichnet einen intrazellulären Recyclingprozess, der durch dynamische Neuordnung von zellulären Membranstrukturen gekennzeichnet ist [1]. Werden extrazelluläre Substrate phagozytiert, spricht man von Heterophagie.

Die Autophagie spielt eine wichtige Rolle bei der Zellantwort auf Stress und steht in enger Beziehung zur Zellentwicklung, der Tumorsuppression, Resistenzen gegenüber Pathogenen und der Verlängerung der Lebensspanne [2].

Die Fähigkeit Proteine abbauen zu können, ist eine essentielle Funktion aller eukaryotischen Zellen. Die Wege zur Wiederverwertung von zytoplasmatischem Material in eukaryoten Zellen sind einerseits die Lysosom-vermittelte Proteolyse (autophagische Proteolyse) und andererseits die Proteasom-vermittelte Degradation [3]. Beide Mechanismen tragen zum Fließgleichgewicht des Stoffwechsels bei.

Durch autophagische Proteolyse ist die Zelle ferner in der Lage sich an veränderte Bedingungen wie z.B. Nährstoffmangel anzupassen. Autophagie ist also eine adaptive Reaktion auf den Hungerzustand [4]. Dieser Überlebensmechanismus erlaubt es der Zelle, bei Abwesenheit von Nahrung essentielle Proteine zu synthetisieren. Dies geschieht, indem zytoplasmatisches Material unselektiv in autophagische Vesikel (Autophagosomen) verpackt, anschließend zur Vakuole transportiert und dort abgebaut wird. Die resultierenden Aminosäuren werden für die Proteinsynthese zur Verfügung gestellt.

In eukaryotischen Organismen hat die Autophagie nicht nur eine Schlüsselfunktion bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase während Hungerphasen, sondern auch bei der Zelldifferenzierung und Entwicklung [5], sowie bei verschiedenen Erkrankungen (siehe auch Kapitel 1.6).

In der Hefe *S. cerevisiae* ist die Autophagie durch äußere Einflüsse induzierbar, wie z.B. durch Inkubation in N-freiem Medium oder Gabe von Rapamycin (Tor-Inhibitor).

Während in Säugerzellen relativ viel über die Regulation der Autophagie, aber wenig über die molekularen Mechanismen bekannt ist, ist die Autophagie in der Hefe gut molekular charakterisiert, aber über die Regulation nur wenig bekannt. In Leberzellen stellen Autophagosomen 0,5 % des Zellvolumens dar. Sie sind dazu in der Lage pro h bis zu 5 % des gesamten intrazellulären Materials zu verdauen. Die autophagische Proteolyse wird in der Säugerleber neben dem Ernährungszustand, Aminosäuren, Hormonen und dem intrazellulären ATP-Gehalt u.a. durch den Hydratationszustand der Zellen reguliert. Hierbei spielt die p38^{MAPK} eine entscheidende Rolle [6]. Das Hefeanalogon zur Säuger p38^{MAPK} ist das Protein Hog1. In dieser Arbeit wird die Rolle des Proteins Hog1, das als MAP-Kinase im *HOG1*-Signaltransduktionsweg bekannt ist, bei der Regulation der autophagischen Proteolyse in Hefe dargestellt.

1.1 Grundlegende Mechanismen der autophagischen Proteolyse

Werden eukaryotische Zellen einem aminosäurefreien Medium ausgesetzt, wird die Autophagie induziert. Es werden dabei unselektiv Teile des Zytoplasmas und Zellorganellen wie Mitochondrien in das Lysosom transportiert und dort degradiert. Die entstehenden Aminosäuren können der Proteinsynthese im Zytoplasma zugeführt oder gespeichert werden. Der Prozess der Autophagie ist seit ca. 50 Jahren in Säugerzellen bekannt. In allen bereits untersuchten kernhaltigen Zellen wurde autophagische Proteolyse beobachtet, wie z.B. in der Leber hungernder Mäuse [7]. Die daran beteiligten Proteine liegen hochkonserviert von Hefezellen bis hin zu Säugern vor und wurden weitgehend in der Hefe *S. cerevisiae* charakterisiert [8].

Durch elektronenmikroskopische Studien wurden zwei Prinzipien der Autophagie beschrieben. Zum einen gibt es die sogenannte **Mikroautophagie**, bei der durch direkte Einstülpung der Lysosomenmembran ein Teil des Zytoplasmas aufgenommen wird, zum anderen die **Makroautophagie**, bei der Teile des Zytoplasmas durch neu entstehende Vesikel eingeschlossen werden [9]. Diese von einer Doppelmembran umhüllten Vesikel werden Autophagosomen genannt. Ihre äußere Membran fusioniert mit der Lysosomenmembran und entlässt das von einer einfachen Membran umhüllte Vesikel ins Lysosomenlumen, woraufhin

dieses dort abgebaut wird [10, 11]. Wie bereits erläutert, konnten durch genetische *Screens* in der Hefe verschiedene Komponenten, die an der Makroautophagie beteiligt sind, identifiziert werden [8] (siehe auch Kapitel 1.2.1). Viele dieser Komponenten teilt sich die Autophagie-Maschinerie mit dem Cvt-Weg (*cytoplasm-to-vacuole targeting*). Über den Cvt-Weg wird u.a. ungereifte Aminopeptidase I (proAPI) selektiv in die Vakuole transportiert (siehe auch Kapitel 1.2.2).

Der Grundmechanismus der Autophagie in der Hefe kann nach heutigem Stand der Forschung in vier Schritte unterteilt werden (entsprechend für den Cvt-Weg) [4]:

1. Induktion

Bildung einer zytoplasmatischen Membran (präautophagosomale Struktur). Bei der Autophagie wird zytoplasmatisches Material unselektiv umschlossen und beim Cvt-Weg wird Proaminopeptidase I selektiv in die Membran verpackt. Der Ursprung der Membran ist noch unbekannt.

2. Segregation (Bildung der Autophagosomen)

Die präautophagosomale Struktur vergrößert sich und bildet ein geschlossenes Autophagosom, das durch eine Doppelmembran gekennzeichnet ist. In Säugerzellen werden die frühen Autophagosomen durch eine [H⁺]-ATPase azidifiziert (späte Autophagosomen) [12]. In Hefezellen findet eine Azidifizierung innerhalb der Vakuole statt [13, 14].

3. Erkennung der Zielstruktur und Fusion mit der Vakuolenmembran

Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert mit der Vakuolenmembran und einlagige autophagische Vesikel werden in die Vakuole entlassen. In Säugerzellen entspricht dieser Vorgang der Fusion der sauren späten Autophagosomen mit den Lysosomen.

4. Lyse der Vesikel und Degradation der Fracht

Die autophagischen Vesikel werden in der Vakuole mittels vakuolärer Hydrolasen lysiert und der Inhalt abgebaut bzw. die proAPI gereift (Cvt-Weg).

1.2 Die Autophagie in der Hefe Saccharomyces cerevisiae

1.2.1 Molekulare Komponenten

Eine Anreicherung autophagischer Vesikel in den Vakuolen Proteinase-defizienter *S. cerevisiae*-Stämme bei N-Mangel wurde erstmals 1992 beschrieben [15, 16]. Aufgrund dieser Beobachtung wurden in drei verschiedenen Arbeitsgruppen, unabhängig voneinander, genetische *Screens* durchgeführt. Gesucht wurde nach Hefe-Mutanten, die keine autophagischen Vesikel in der Vakuole anreicherten (Apg-*Screens* (*Autophagy*, Apg-Proteine): [17, 18]; Aut-*Screens* (*Autophagy*; Aut-Proteine): [19]).

Mit Hilfe dieser Forschungsarbeiten wurde das Verständnis über den Mechanismus der Autophagie erweitert.

Die Charakterisierung der identifizierten Proteine in der Hefe zeigte außerdem, dass die meisten dieser Proteine auch am Transport der Proaminopeptidase I (proAPI) aus dem Zytoplasma in die Vakuole, dem Cvt-Weg (*cytoplasm-to-vacuole targeting*), beteiligt sind [20, 21].

Im Jahr 2003 wurde für diese, an der Autophagie und dem Cvt-Weg beteiligten Komponenten (Atg), erstmals eine einheitliche Nomenklatur festgelegt [8].

Die Untersuchung weiterer komplexerer Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, Mäuse und auch Säugerzellen zeigte eine Relevanz der Autophagie für verschiedene physiologische Prozesse [4]. Ein Autophagiedefekt im Menschen wurde unter anderem mit der Entstehung bestimmter Formen des Mammakarzinoms und weiterer Erkrankungen in Verbindung gebracht [22, 23] (siehe Kapitel 1.6).

Nach dem heutigen Stand der Forschung konnten in der Hefe 27 Proteine identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Autophagie und dem Cvt-Weg stehen. Nachfolgend werden diese Komponenten unter Berücksichtigung ihrer wahrscheinlichen Funktion beschrieben (Tab. 1). Die vor dem Jahr 2003 verwendeten Bezeichnungen der Proteine wurden ebenfalls aufgeführt.

Bezeichnung des Proteins				
gültige ehemalige		ge		
Atg	Apg	Aut	Cvt	Eigenschaften
1	1	3	10	Proteinkinase
2	2	8	-	interagiert mit Atg9
3	3	1	-	E2-ähnliches Enzym; konjugiert Atg8 mit PE
4	4	2	-	Cystein-Protease; spaltet C-terminales Ende oder PE von Atg8
5	5	-	-	konjugiert mit Atg12
(6) ^a	6	-	-	Komponente des PtdIns-3-Kinase-Komplexes I und II
7	7	-	2	E1-ähnliches Enzym; aktiviert Atg8 und Atg12
8	8	7	5	Ubiquitin-ähnliches Protein; konjugiert mit PE über C-terminales Glycin
9	9	9	7	integrales Membranprotein
10	10	-	-	E2-ähnliches Enzym; konjugiert Atg12 mit Atg5
11	-	-	9	Rolle bei Fracht-Erkennung
12	12	-	-	Ubiquitin-ähnliches Protein; konjugiert mit Atg5 über C-terminales Glycin
13	13	-	-	modifiziert Atg1-Aktivität; hyperphosphoryliert in Vollmedium
14	14	-	12	Komponente des PtdIns-3-Kinase-Komplexes I
15	-	5	17	mutmaßlich eine Lipase mit Rolle beim Abbau von intravakuolären Vesikeln
16	16	-	11	Komponente des Atg12-Atg5-Komplexes
17	17	-	-	modifiziert Atg1-Aktivität
18	-	10	18	peripheres Membranprotein; benötigt für die Lokalisation von Atg2
19	-	-	19	Fracht-Rezeptor für den Cvt-Weg
20	-	-	20	PX-Domänen-Protein; Cvt-Weg
21	-	(-) ^b	21	spezifisch für den Cvt-Weg
22	-	4	-	integrales Membranprotein mit Rolle beim Abbau von Autophagosomen
23	-	(-) ^c	23	für die Fertigstellung von Cvt-Vesikeln
(24) ^d	-	-	13	PX-Domänen-Protein; Cvt-Weg und Pexophagie
25	-	-	-	coiled-coiled Protein; Makropexophagie
26 ^e	-	-	-	UDP-Glucose; Sterol-Glucosyltransferase
27 ^f	-	-	24	PtdIns(3)P-bindendes Protein; Cvt-Weg
a b c d	Standardname Dieses Proteir Dieses Proteir	e für dies wurde wurde	ses Protei Mai1 ben Mai2 ben	in Vps30. annt. annt.

andardname für dieses Pr otein Snx4. е

Dieses Protein wurde Ugt51 benannt. Dieses Protein wurde Etf1 benannt. f

Tab. 1: An Autophagie-/Cvt-Weg beteiligte Komponenten. Ausschnitt aus [8].

1.2.2 Die Autophagie und der Cvt-Weg

Unter nährstoffreichen Bedingungen wird ungereifte Aminopeptidase I (proAPI) selektiv über den **Cvt-Weg** in die Vakuole transportiert [24, 25]. Beide Transportwege nutzen sehr ähnliche Proteinkomponenten für den Vakuolenimport [20, 21]. Der wesentliche Unterschied ist, dass die Autophagie unselektiv zytoplasmatisches Material dem Abbau zuführt, wohingegen der Cvt-Weg selektiv die vakuolären Enzyme bzw. ihre ungereiften, inaktiven Formen proAPI und α -Mannosidase in die Vakuole transportiert, die dort gereift werden [25].

Der Cvt-Weg ist konstitutiv aktiv, während die Autophagie Hunger-induziert ist. Unter Wachstumsbedingungen besitzt die Autophagie in der Hefe eine niedrigere Gesamtaktivität [2]. Bei Induktion der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium oder Gabe von Rapamycin (Tor-Inhibitor) bilden sich Autophagosomen an einer subzellulären Struktur im Zytoplasma, der präautophagosomalen Struktur (PAS). Dieser Prozess wird Segregation genannt.

In der Hefe sind Autophagosomen in der Regel Vesikel mit einem Durchmesser von 300-900 nm, die von zwei Membranen umgeben sind [15]. Cvt-Vesikel erreichen indes einen Durchmesser von 140-160 nm [26]. Ansonsten unterscheiden sie sich nur in ihrer transportierten Fracht. Bei der Fusion mit der Vakuole verschmilzt die äußere Autophagosomenmembran mit der Vakuolenmembran und das innere Vesikel wird ins Lumen entlassen und degradiert. Die genauen Entstehungsmechanismen der präautophagosomalen Struktur sind, trotz der erheblichen wissenschaftlichen Aktivitäten auf diesem Gebiet, noch umstritten.

1.2.3 Die Inaktivierung von Tor führt zur Induktion der Autophagie

Die Induktion der Autophagie wird über den Tor (<u>target of rapamycin</u>)-regulierten Atg13/Atg1-Kinase-Komplex kontrolliert. Unter nährstoffreichen Bedingungen hemmt Tor die Autophagie. Bei Nährstoffmangel wird die Tor-Kinase inhibiert, was unter anderem zur Bildung von Autophagosomen führt.

Die Segregation steht in Wechselwirkung mit dem Phosphorylierungszustand von Atg13 [27, 28] (Abb. 1, oberer Teil). Die hyperphosporylierte Form von Atg13 hat

eine niedrigere Affinität zur Kinase Atg1. Diese reduzierte Interaktion hemmt vermutlich die Autophagie [29] (Abb. 1, Kasten). Eine Inhibition von Tor durch N-Mangel oder Zugabe von Rapamycin bewirkt hingegen die Induktion der Autophagie. Dies führt zu einer partiellen Dephosphorylierung von Atg13 [30] und einer gesteigerten Aktivität der Atg1-Kinase [29] (Abb. 1, unterer Teil). Diese Affinitätssteigerung wird als Schlüsselereignis bei der Induktion der Autophagie angesehen (Abb. 1, Kasten). Genaueres über den molekularen Mechanismus der Inhibition bzw. Aktivierung von Tor in der Hefe ist noch nicht bekannt [31]. Außerdem führt die Inhibition von Tor zu einer erhöhten Synthese von Atg8 [32]. Momentan ist Atg8 das einzige bekannte Autophagie-relevante Protein, dessen Expression als Antwort auf Hungerung gesteigert wird [33].



Abb. 1: Modell der Autophagie-Induktion über Tor. Modifiziert nach [29].

1.2.4 Segregation

Neben der Tor-abhängigen Induktion der Autophagie sind folgende Proteinkomponenten für die Bildung der Autophagosomen und Cvt-Vesikel notwendig [34-37]. Dabei handelt es sich zum einen um das **Atg12-Atg5-Konjugationssystem** und zum anderen um die **Membranrekrutierung von Atg8**. Beide Systeme sind dem Ubiquitin-Konjugationssystem ähnlich.

1.2.4.1 Das Atg12-Atg5-Konjugationssystem initiiert die Segregation

Beim Atg12-Atg5-Konjugationssystem wird das Protein Atg12 durch Atg7 aktiviert und durch die Interaktion mit Atg10 mit Atg5 konjugiert. Das Protein Atg16 dimerisiert und bildet ein Paar von Atg12-Atg5-Konjugaten (Abb. 2).

Vergleichbar mit dem Ubiquitin-Konjugations-system, benötigt der gerade beschriebene Prozess ein dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 homologes Protein, das Atg7. Es aktiviert das C-terminale Glycin von Atg12 durch ATP-Hydrolyse, indem es eine Thioesterbindung mit ihm eingeht [38]. Das Protein Atg12 wird danach auf Atg10 übertragen, das einem E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym entspricht. Atg10 vermittelt anschließend die kovalente Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der Carboxy-Gruppe von Atg12 und der ε-Aminogruppe von Lys149 in Atg5. In der Hefe geht Atg5 eine Wechselwirkung mit homooligomerisiertem Atg16 ein, was zur Bildung eines multimeren Komplexes führt [39]. Der Großteil dieses Konjugats ist im Zytoplasma lokalisiert und nur ein kleiner Teil ist nahe der Vakuole in der präautophagosomalen Struktur (PAS) zu finden, von der die Bildung der Autophagosomen ausgeht [37, 40].



Abb. 2: Modell des Atg12-Atg5 Konjugatioinssystems. Auschnitt aus Abb. 4.

1.2.4.2 Die Membranrekrutierung von Atg8 ist essentiell für die Segregation

Die Bildung des Atg12-Atg5-Konjugats ist Voraussetzung für die Membranrekrutierung von Atg8. Auch hier bestehen Ähnlichkeiten zum Ubiquitin-Konjugationssystem.

Das C-terminale Arginin von Atg8 wird durch Atg4 abgespalten und Atg8 über das freiwerdende Glycin durch Atg7 (E1-Enzym) und Atg3 (E2-Enzym) auf Phosphatidylethanolamin (PE) übertragen (Abb. 3) [41-43]. Die Verknüpfung mit dem Lipid ermöglicht dem hydrophilen Protein Atg8 die Membranbindung, so dass es auf der Membran der Autophagosomen lokalisiert ist [32]. Atg8 wird unter Hungerbedingungen verstärkt exprimiert [32, 33].

Analog zum Hefeprotein Atg8 wird das orthologe Säugerprotein LC3 (*light chain*) ebenfalls an einem konservierten C-terminalen Glycin prozessiert. Es entsteht die aktivierte LC3-I Form; die anschließend modifizierte LC3-II Form konnte an der

Oberfläche von Autophagosomen lokalisiert werden [44]. Zwar ist die Modifikation von LC3-II noch nicht bekannt, aber es ist anzunehmen, dass LC3 eine ähnliche Funktion wie Atg8 einnimmt und deshalb ebenfalls mit einem Phosphoglycerollipid konjugiert wird.



Abb. 3: Modell der Membranrekrutierung von Atg8.Modifiziert nach [43].GRGlycin-ArgininGGlycin

Letztlich führt die Interaktion der drei beschriebenen Prozesse:

- Tor-Inaktivierung
- Atg12-Atg5-Konjugation
- Membranrekrutierung von Atg8

zur Segregation, d.h. der Bildung von Autophagosomen (Abb. 4). Die Segregation gilt nach momentanem Verständnis als Zielelement der Regulationsmechanismen der Autophagie. Es ist bisher noch immer unverstanden wie sich Autophagosomen bilden. Eine große Schwierigkeit in der Entschlüsselung dieses Prozesses stellt die Tatsache dar, dass der Ursprung und die Art und Weise des Transportes der Lipide, die diese Strukturen bilden, unbekannt ist. In der Hefe ist Atg9 das einzige bekannte integrale Membranprotein, dass essentiell für die Bildung von Vesikeln mit einer Doppelmembran ist. Wahrscheinlich wird Atg9, zusammen mit den zur Bildung benötigten Lipiden oder zumindest Teilen der Lipiddoppelschicht, zum Ort der Autophagosomenbildung, der präautophagosomalen Struktur (PAS), transportiert.



Abb. 4: Modell der Autophagie in der Hefe S. cerevisiae.

Nach Dephosphorylierung von Atg13 durch Inaktivierung von Tor steigt die Affinität zu Atg1, ein Komplex mit weiteren Co-Faktoren bildet sich aus, und die Segregation wird initiiert. Das Atg12-Atg5-Konjugat und das Protein Atg16 sind an der präautophaosomalen Struktur (PAS) lokalisiert. Während das Autophagosom zur Vakuole transportiert wird, werden das Atg12-Atg5-Konjugat und das Protein Atg16 von der Autophagosomenmembran wieder ins Zytoplasma abgegeben. Atg8 wird zusätzlich zum sich bildenden Autophagosom rekrutiert und mit diesem zur Vakuole transportiert und dort degradiert.

1.3 Osmotischer Stress in Hefe als Sonderform des "environmental stress"

Die Hefezelle ist unter physiologischen Bedingungen erheblichen extrazellulären osmotischen Schwankungen ausgesetzt. Hypoosmotischer Stress (Regenschauer, Waschschritte mit Wasser in der Laborroutine) entsteht für die Zelle, wenn die Konzentration gelöster Stoffe in der extrazellulären Umgebung durch Verdünnung niedriger wird, als die Konzentration gelöster Stoffe im Zytoplasma. Hyperosmotischer Stress entsteht, wenn die Konzentration gelöster Substanzen in der extrazellulären Umgebung zunimmt (Dürre, salzige Habitate). Neben einer Osmolaritätsschwankung verursachen eine Vielzahl von anderen Faktoren wie Nährstoffmangel, Sauerstoffverfügbarkeit, Temperaturniveau, Schwermetallkonzentration, pH-Wert und DNA-zerstörende Substanzen für Hefezellen ebenfalls eine Stresssituation. Um die Zellintegrität und das Zellwachstum zu gewährleisten, existieren bestimmte Gegenregulationsmechanismen. Im folgenden Abschnitt wird die Adaptationsreaktion einer Hefezelle bei osmotischem Stress näher erläutert.

Als Osmoregulation wird der Vorgang der Einstellung eines Gleichgewichts bezeichnet (Adaptation), bei dem das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen gewährleistet ist [45]. Osmotolerantes Verhalten bezeichnet dementsprechend die Fähigkeit einer Zelle, sich veränderter Umgebungsosmolarität anzupassen zu können. Eine besondere Herausforderung für die Hefezelle stellt die Kontrolle ihres Wassergehalts bei osmotischem Stress dar. intrazellulären Wassergehaltes Eine Veränderung des verursacht eine Veränderung der Stoffwechselvorgänge innerhalb der Zelle [46, 47]: Die Dehydrierung der Zelle führt zu einer Konzentrierung des zytoplasmatischen Inhaltes, gefolgt von einer Schädigung des Zytoskeletts [48]. Der Transport und die Synthese von Proteinen sowie eine Vielzahl von enzymatischen Reaktionen werden modifiziert [49, 50] und es kommt zu einem Wachstumsstop [51].

Hefezellen sind bei der alkoholischen Gärung zu Beginn von einer 20 %-igen Zuckerlösung umgeben. Während des gesamten Gärprozesses bleiben die Zellform sowie die Zellaktivität jedoch stabil. Eine zentrale Rolle für die Zellstabilität spielt daher die Osmoregulation.

1.3.1 Osmoregulation

Ist eine Zelle osmotischem Stress ausgesetzt, können zwei unterschiedliche Adaptionsvorgänge beobachtet werden:

- Bei einem hypoosmotischen Schock kommt es innerhalb von Sekunden zu einem Wassereinstrom in die Zelle. Dies hat einen Anstieg des Turgordrucks (Zellinnendruck) und Zellschwellung zur Folge. Eine aktive Zellvolumenregulation (RVD, <u>regulatory cell volume decrease</u>) wird mittels gleichzeitigem, selektivem Export gelöster Stoffe durch spezifische Kanäle/Poren erreicht. Es kommt zur Adaptation der Zelle durch einen passiven Wasserausstrom und der damit verbundenen Reduktion des Turgordrucks [50, 52].
- Bei einem hyperosmotischen Schock verringert sich innerhalb von ein bis zwei Minuten das Zellvolumen durch einen schnellen Wasserausstrom. Der Verlust des Turgordrucks führt zur Schrumpfung der Zelle (RVI, <u>regulatory cell volume increase</u>). Es werden osmotisch aktive Substanzen akkumuliert. Diese Adaptation beinhaltet die passive Aufnahme von Wasser und die Stabilisierung des Turgordruckes und gewährleistet so die Zellstabilität der Mikroorganismen [47, 53].

Bei einer starken Erhöhung der extrazellulären Osmolarität durch Zusatz löslicher Substanzen zum Nährmedium (z.B. NaCl oder Sorbitol) ohne Gegenregulation der Hefezelle kommt es zur sogenannten Plasmolyse. Das Volumen der Zelle verringert sich innerhalb einer Minute um 45 bis 53 % des Ausgangsvolumens [54, 55]. Die Plasmamembran von *S. cerevisiae* besitzt eine sehr hohe Wasserpermeabilität, wofür möglicherweise spezifische Aquaporine verantwortlich sind [50]. Einhergehend mit der Volumenverringerung der Zelle bei der Plasmolyse reduziert sich das Volumen der Vakuole. Eine intakte Vakuole ist essentiell für ein Überleben der Zelle unter osmotischen Bedingungen [50]. Neben den gerade beschriebenen Zellveränderungen kann u.a. eine Veränderung des Zytoskeletts mit Verlust der Polarität festgestellt werden [48].

Für die Gewährleistung des Zellwachstums und Zellstoffwechsels ist die Wiederherstellung des intrazellulären osmotischen Zelldruckes (Turgor) essentiell. Innerhalb von zwei h nach einem osmotischen Schock erfolgt die Rückführung des Zellvolumens (RVI, <u>regulatory cell volume increase</u>) [45].

Es ist nicht genau bekannt, ob die Osmoregulationsmechanismen der Hefe (RVD, RVI) jeweils zu einer vollständigen Restitution des ursprünglichen Zellvolumens führen. Theoretisch könnten auch an der Hefezelle, ebenso wie in Leberzellen, dauerhafte leichte Schwellungs- bzw. Schrumpfungszustände erzeugt werden [56].

Während die Adaptation der Zelle an die Umgebung erfolgt und die Ausgangsgröße der Zelle weitgehend wieder hergestellt wird, beginnt die Akkumulation von kompatiblen, osmotisch aktiven Substanzen, auch "kompatible Osmolyte" genannt. Es handelt sich hierbei um Ionen oder Moleküle, die osmotisch aktiv sind. Eine Akkumulation dieser Stoffe beeinträchtigt die intrazellulären Stoffwechselvorgänge nicht, d.h. sie verhalten sich "kompatibel".

Hefen akkumulieren hauptsächlich Polyole. Bei der Hefe S. cerevisiae konnte nur Glycerin als maßgebender Osmolyt festgestellt werden [45, 54, 57]. Durch die Bildung von Glycerin kann die Zelle bis zu 95 % des externen osmotischen Drucks ausgleichen. Zellen von S. cerevisiae können bei stark erhöhter extrazellulärer Osmolarität intrazellulär bis zu 1 M Glycerin anreichern [57]. Außerdem können "Osmoprotektor" Glycerin gelöste Proteine durch den stabilisiert und osmosensitive Zellfunktionen innerhalb der Zelle geschützt werden. Neben Glycerin wird in geringer Menge Trehalose als weitere osmotisch aktive Substanz der Zelle synthetisiert. Im Veraleich zu den synthetisierten von Glycerinkonzentrationen wird ca. 20 % Trehalose gebildet. Demnach wird die interne Osmolarität der Zelle nur in geringem Maße durch die Trehalosesynthese stabilisiert [58, 59].

In der Säugerleber wurden bisher als maßgebende kompatible Osmolyte Inosit, Betain [60] und Taurin [61] identifiziert (siehe auch Kapitel 1.5).

Die Kontrolle der intrazellulären Glycerinkonzentration ist auf vier verschiedenen Ebenen vorstellbar:

- 1. Kontrolle der Synthese
- 2. Kontrolle der Aufnahmekapazität aus dem extrazellulären Medium
- 3. Kontrolle des Glycerinexports aus der Zelle
- 4. Kontrolle des Glycerinabbaus bzw. Glycerinstoffwechsels.

Die der Hefe *S. cerevisiae* wird die Akkumulation von Glycerin hauptsächlich über den Syntheseweg und den Exportmechanismus kontrolliert [58, 62]. Dieser physiologische Reaktionsmechanismus der Zelle ist seit mehr als 15 Jahren bekannt. Die molekularen Grundlagen der Regulation des Glycerinsyntheseweges hingegen sind erst in den letzten Jahren näher untersucht worden. Experimentelle Untersuchungen über die beteiligten Signalübertragungswege sind immer noch Gegenstand der Forschung [50].

In dieser Arbeit wird die MAP-Kinase Hog1 als Osmoregulationselement der Autophagie in der Hefe charakterisiert.

1.3 MAPK-Signalwege in Saccharomyces cerevisiae

MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-abhängige Signalwege liegen in eukaroytischen Zellen hochkonserviert vor und können sowohl durch extrazelluläre als auch intrazelluläre Signale aktiviert werden. Sie kontrollieren grundlegende Prozesse wie das Zellwachstum, die Morphogenese, die Proliferation und die Stressantwort [50, 51].

Ein MAPK-Signalweg wird durch drei Protein-Kinasen charakterisiert: eine MAP-Kinase (MAPK), eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK).

Die MAPKKK aktiviert die MAPKK durch Phosphorylierung von konservierten Serin/Threonin-Resten. Anschließend phosphoryliert die MAPKK die MAPK an Threonin-, machmal auch Serin/Tyrosin-Resten. Eine zweifache Phosphorylierung (Di-Phosphorylierung) ist für die Aktivierung der MAPK notwendig. Die Phosphorylierung stimuliert in einigen Fällen einen Transfer der MAPK vom Zytoplasma in den Zellkern, woraufhin weitere Zielproteine durch Phosphorylierung an Serin/Tyrosin-Resten aktiviert werden [50].

In der Hefe S. cerevisiae sind sechs verschiedene MAPK-Signalwege bekannt:

- 1. *mating pheromone response pathway* (MAPK: Fus3)
- 2. pseudohyphal development pathway (Kss1)
- 3. HOG1 pathway (Hog1)
- 4. *cell integrity pathway* (Slt2 / Mpk1)
- 5. spore wall assembly pathway (Smk1)
- 6. STE vegetative growth pathway (Kss1)

Bisher war das Protein Hog1 in der Hefe nur als MAP-Kinase im *HOG1*-Signaltransduktionsweg bekannt, der im folgenden Abschnitt genauer beschrieben (Abb. 5).

1.4.1 Der HOG1-Signaltransduktionsweg in der Hefe Saccharomyces cerevisiae

Werden Hefezellen in einem hyperosmotischen Medium kultiviert, dann bricht der Konzentrationsgradient entlang der Zellmembran zusammen, das Zellwachstum stoppt, die Konzentration des Aktinzytoskeletts reduziert sich [48], die Proteinsynthese wird vermindert [49] und die Konzentration von intrazellulären Makromolekülen steigt an [51]. Ein Großteil dieser Zellantwort wird bei Osmolaritätsveränderungen durch die Aktivierung von Hog1 ausgeglichen [63, 64]. *HOG1*-defiziente Hefezellen halten höhergradigem osmotischem Stress nicht stand.

Der in Abb. 5 dargestellte HOG1-Signaltransduktionsweg gehört zu der Gruppe der MAP-Kinase Wege und ist aus einer Kaskade von drei Protein-Kinasen aufgebaut [65, 66], der MAP-Kinase (MAPK) Hog1, der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) Pbs2 und den MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK) Ssk2 und Ssk22. Zwei transmembrane Proteine Sln1 und Sho1 übernehmen die Funktion der Osmosensoren. Bei niedriger Osmolarität (Hypoosmolarität) ist SIn1 autophosphoryliert und die Phosphatgruppe wird über Ypd1 nach Ssk1 übertragen. Liegt Ssk1 in der phosphorylierten Form vor, wird der HOG1-Weg nicht stimuliert. Bei einer Veränderung der extrazellulären Osmolarität (hohe Osmolarität > 0,4 M NaCl) wird Sln1 inaktiviert, folglich das Protein Ssk1 dephosphoryliert und somit die nachfolgende MAP-Kinase-Kaskade aktiviert. Der zweite bekannte Osmosensor Sho1 aktiviert über einen ähnlichen Mechanismus (Phosphorylierung von Ste20 und Ste50 mittels eines Cdc24/Cdc42-Komplexes) das Protein Ste11 und anschließend die MAPKK Pbs2. Beide Osmosensoren aktivieren den HOG1-Weg über die MAPKK Pbs2. Bei niedriger extrazellulärer Osmolarität (< 0,4 M NaCl) ist die Signalübertragung über den Weg Sln1/Pbs2 langsamer als über den Sho1/Pbs2-Weg. Das phosphorylierte Ssk1 wirkt als Suppressor [50]. Die Bedeutung dieser unterschiedlichen funktionalen Übertragungswege konnte bisher nicht geklärt werden.

Es wurden Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die *HOG1*-abhängige Zellantwort auf Transkriptionsebene regulieren (Msn2 und Msn4) [67]. Sie sind für die Regulation der Transkription von Genen mit stressprotektiver Funktion wie

GPD1 (<u>G</u>lycerol-3-<u>P</u>hosphat-<u>D</u>ehydrogenase1) und *GPP2* (<u>G</u>lycerol-3-<u>P</u>hosphat-<u>P</u>hosphatase2) notwendig.

Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Menge an gebildeten Msn2 und Msn4 im Zytosol gering. Hingegen verursacht eine osmotische Stresssituation eine vermehrte Expression von Transkriptionsfaktoren und einen vermehrten Transfer vom Zytosol in den Zellkern [51]. Demnach ist der begrenzende Faktor der Regulation des *HOG1*-Weges sehr wahrscheinlich die Kontrolle der Expression von *MSN2* und *MSN4* [68, 69].

Es ist gesichert, dass der *HOG1*-Signaltransduktionsweg die Transkription von *GPD1* und *GPP2* kontrolliert [70]. Unter osmotischen Stressbedingungen wird die Glycerinsynthese durch eine erhöhte Synthese von Gpd1 und Gpp2 stimuliert [50]. Mit Hilfe der vermehrten Bildung von Glycerin kann die Hefezelle den externen osmotischen Druck ausgleichen und eine Zellschädigung wird verhindert.



Abb. 5: Der HOG1-Signalweg in der Hefe *S. cerevisiae*. Modifiziert nach [67]. TF Transkriptionsfaktoren

1.5 Die autophagische Proteolyse in der Säugerleber

Die Tatsache, dass die autophagische Proteolyse in der Säugerleber über den zellulären Hydratationszustand Mikrotubuli- und p38^{MAPK}-abhängig reguliert wird [71], könnte auf eine spezifische Funktion von Hog1, dem Hefeortholog der p38^{MAPK}, für die Autophagie der Hefe hinweisen.

In der Leber sind verschiedene proteolytische Vorgänge bekannt. Zum einen die Ubiquitin-abhängige Proteolyse, die in speziellen Organellen, den Proteasomen, stattfindet und dem Abbau defekter oder kurzlebiger Proteine dient [72]. Zum anderen die autophagische Proteolyse. Sie spielt in der Leber im Hungerzustand und in Abwesenheit von Aminosäuren die Hauptrolle [73-75]. Hierbei werden ca. 70-80 % des intrazellulären Leberproteins in den Autophagosomen prozessiert.

Leberzellen sind in der Lage, pro h bis zu 5 % ihres intrazellulären Proteins mittels der autophagischen Proteolyse zu verdauen [76].

Die Proteolyse in der Säugerleber wird durch den Ernährungszustand, Aminosäuren, Hormone und oxidativen Stress, sowie das Zellvolumen reguliert (Tab. 2). Die Leberzelle besitzt volumenregulatorische Mechanismen, um übermäßiger Schwellung oder Schrumpfung entgegenzuwirken [52]. Ein wichtiger Mechanismus, der die Zellvolumenveränderungen bei anisoosmolarer Exposition reguliert, ist die Akkumulation oder Freisetzung von sogenannten Osmolyten (z.B. Inosit, Taurin, Betain). Zellschwellung hat einen antiproteolytischen Effekt, Zellschrumpfung führt zur gesteigerten Proteolyse (Tab. 2). Hierbei spielt die p38^{MAPK} eine entscheidende Rolle. Das *S. cerevisiae* Protein Hog1 ist das Ortholog zur Säuger p38^{MAPK}.

	gesteigerte Proteolyserate	verminderte Proteolyserate
durch		
	Hypertonizität (Zellschrumpfung)	Hypotonizität (Zellschwellung)
	Hungerung	Insulin
	cAMP	Aminosäuren
	Glucagon	Ethanol
	oxidativer Stress	IGF-1
		Bumetanid

Tab. 2: Der Effekt von verschiedenen Stimuli auf die Proteolyse in Leberzellen. Aus [77].

Osmosensing über die p38^{MAPK} ist notwendig für die Regulation der Proteolyse [6]. So führen hypoosmotische Exposition und Gabe von Aminosäuren zum Schwellen der Hepatozyten in der Säugerleber [78, 79]. Die Zellschwellung führt zur Hemmung der Proteolyse (Abb. 6). Zu den Agonisten, die zur Zellschwellung führen, gehören u.a. die Aminosäuren Glutamin, Glycin und Alanin, Insulin, Gycerin, Taurocholsäure und Ethanol. In dem Ausmaß, in dem durch diese Agonisten der zelluläre Wassergehalt ansteigt, kommt es auch zur Hemmung der Proteolyse. Die Zellschrumpfung bewirkt die Stimulation der Proteolyse. Zu den Agonisten, die eine Zellschrumpfung bewirken gehören u.a. Glucagon, cAMP und Harnstoff. Das Ausmaß der Zellschrumpfung steht in linearem Verhältnis zur somit erzielten Steigerung der Proteolyse [77, 80, 81].

Die genauen Mechanismen, die zur Hemmung und Steigerung der Proteolyse führen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung.





1.6 Klinische Bedeutung der Autophagie

Die Identifizierung von Autophagie-relevanten Genen in der Hefe und entsprechender Orthologe in anderen Organismen weist auf die hohe Konservierung dieses Mechanismus in Mittels Eukaryonten hin. molekulargenetischer und molekularbiologischer Techniken wurde die Autophagie in verschiedenen Modellsystemen untersucht. Einige morphologische Studien zeigen, dass bei bestimmten Erkrankungen eine Störung oder nachhaltige Veränderung der Autophagie nachweisbar ist (Tab. 3). Ob eine gesteigerte Autophagieaktivität der Ausdruck eines adaptiven oder primär pathogenen Geschehens ist, ist noch unklar [23].

Erkrankung	günstige Autophagie- Effekte	negative Autophagie- Effekte
Bösartige Tumoren z.B. Mammakarzinom [82]	wirkt als Tumorsuppressor; möglicherweise beteiligt an Typ II PCD (<i>programmed</i> <i><u>cell d</u>eath</i>) in Krebszellen; könnte Zellgröße limitieren oder freie Radikale bilden; steigert Mutationen in Tumor- zellen	könnte das Überleben von Tumorzellen unter nährstoff -armen Bedingungen ermöglichen; könnte Zelltod verhindern und zytostatische Resistenzen vermitteln
α ₁ -Antitrypsinmangel [83]	ermöglicht das Entfernen von nicht funktionellem ER (Akkumulation von α_1 -Anti- trypsin-Z-Protein-Aggregaten)	gesteigerte Sterblichkeit durch übermäßige mito- chondriale Autophagie
Hereditäre Muskeldystrophie [84]	gesteigerte Autophagie könnte funktionelle Defekte des Lysosoms ausgleichen	gesteigerte Autophagie oder Autophagiedefekte führen zu einer Akkumulation von Autophagosomen, die die Zellfunktion schädigt
Neurodegenerative Erkrankungen z.B. Chorea Huntington [85]	ermöglicht das Entfernen von toxischen Proteinaggregaten (Huntingtin-Aggregate)	könnte Zelltod von Neuronen induzieren, in denen Proteinaggregate akkumulieren
Infektionskrankheiten durch Bakterien, Viren und Parasiten [86]	Abwehr von pathogenen, infektiösen Agenzien	verminderte Autophagie ermöglicht replikative Nische für Pathogene

Tab. 3: Mögliche klinische Bedeutung der Autophagie.Aus [23].

II Fragestellung

Der unselektive Proteinabbau durch Bildung von Autophagosomen wird als autophagische Proteolyse bezeichnet. Im Gegensatz zur Ubiquitin-abhängigen Proteolyse sind hieran Lysosomen beteiligt. In eukaryotischen Organismen besitzt die Autophagie eine Schlüsselfunktion während Hungerphasen, d.h. in Abwesenheit von Aminosäuren. Sie dient unter anderem der Aufrechterhaltung Energiehaushaltes und der Bereitstellung des von Aminosäuren zur Proteinsynthese. Während die Autophagie früher als rein metabolisches Phänomen verstanden wurde, ist heute bekannt, dass sie bei der Zellreifung und Zelldifferenzierung, bei immunologischen Mechanismen und bei der Apoptose eine wichtige Rolle spielt.

In der Hefe sind die molekularen Komponenten der Autophagie schon weitgehend charakterisiert, in Säugerzellen hingegen noch meist unverstanden. Während über die Adaptationsmechanismen der Autophagie in Säugerzellen schon recht viel bekannt ist, sind die Autophagie-regulierenden Signalwege in Hefezellen noch weitgehend unbekannt.

In der Säugerleber wird die autophagische Proteolyse neben Aminosäuren, Hormonen, dem Ernährungszustand und dem intrazellulären ATP-Gehalt u.a. durch den Hydratationszustand der Zellen reguliert. Zellschwellung führt zur Hemmung der autophagischen Proteolyse, während Zellschrumpfung zur Stimulation der Proteolyse führt. Hierbei spielt die p38^{MAPK} eine entscheidende Rolle. Das Hefeanalogon zur Säuger p38^{MAPK} ist das Protein Hog1. In der Hefe kann eine Stimulation der Autophagie durch N-freies Medium oder durch Zugabe von Rapamycin erzielt werden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher der Zusammenhang zwischen osmotischem Stress und der Autophagie in Hefe.

Folgende Fragen sollten erarbeitet werden:

 Spielt HOG1 in der Hefe - in Analogie zur Säugerleber - eine Rolle bei der autophagischen Proteolyse? Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, wie eine Deletion von HOG1 in der Hefe die Autophagie während nicht-letalem osmotischem Stress beeinflusst.

- 2. Ist die oberhalb von Hog1 gelegene Signalkaskade der Osmoregulation (Pbs2, Sho1, Sln1) hieran beteiligt?
- 3. Bestehen Unterschiede in der Adaptation an osmotischen Stress zwischen der durch Inkubation in N-freiem Medium oder Rapamycin induzierten autophagischen Proteolyse?
- 4. Welche molekularen Mechanismen sind beteiligt?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten zunächst am Modellorganismus der Hefe *S. cerevisiae* geeignete Methoden zur Visualisierung der Autophagie und Messung der Autophagieaktivität bzw. der Proteolyserate entwickelt werden. Die erarbeiteten Zusammenhänge sollten dann quantitativ sowie molekular charakterisiert werden und die Ergebnisse auf ihre Übertragbarkeit auf Säugerzellen diskutiert werden.

III Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Stämme

S. cerevisiae-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
WCG4a	MAT $lpha$ ura3 his3-11,15 leu2-3,112	[19]
YTP1	MATα ura3 his3-11,15 leu2-3,112 hog1Δ::KAN ^R	(diese Arbeit)
YTP2	MATα ura3 his3-11,15 leu2-3,112 pbs2Δ::KAN ^R	(diese Arbeit)
YTP3	MAT α ura3 his3-11,15 leu2-3,112 sho1 Δ ::KAN ^R	(diese Arbeit)
YTP4	MAT α ura3 his3-11,15 leu2-3,112 sln1 Δ ::KAN ^R	(diese Arbeit)
YSR2	MATα ura3 his3-11,15 leu2-3,112 aut9∆::KAN ^R	[87]
atg8∆	MATα ura3 his3-11,15 leu2-3,112 atg8∆::KAN ^R	[33]
atg13∆	MAT $lpha$ his3 Δ 1 leu2- Δ 0 met15- Δ 0 ura3- Δ 0 atg13 Δ ::KAN ^R	(Euroscarf, Frankfurt a. M.)
pep4∆	MATa WCG4a pep4∆::HIS3	[19]

E. coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle	
DH5α	F'(Φ 80 (∆lacZ) M15) Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 r₅ m₅ supE44 thi-1 gyrA relA1	[88]	

3.1.2 Plasmide

Plasmid Be	schreibung	Quelle
pUG6	Plasmid zur Herstellung von Deletionskonstrukten. Es enthält einen Replikationsursprung (ori) und als Deletionskassette das Kanamycinresistenzgen unter Kontrolle von Promotor und Terminator des <i>TEF</i> -Gens aus <i>Ashbya gossypii</i> [90]. Außerdem wird das Kanamycingen flankiert von den Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (loxP). Mit geeigneten Oligonukleotiden können durch PCR (3.2.2.7) die loxP- <i>KAN</i> ^R -loxP-Kassette sowie flankierende Bereiche des zu deletierenden Gens synthetisiert und durch homologe Rekombination zur Herstellung eines Deletionsstammes verwendet werden.	[89]
pGFP-N/ <i>ATG8</i>	Fusion von GFP mit Atg8 unter natürlichem ATG8-Promotor in pRS316 mit URA3-Marker.	[91]
pGFP-N/ <i>ATG</i> 9	Fusion von GFP mit Atg9 unter natürlichem ATG9-Promotor in pRS316 mit URA3-Marker.	[87, 92]
pAtg13	Plasmid zur Überexpression von Atg13 unter natürlichem Promotor in 2µ-Plasmid mit <i>URA3</i> -Marker.	[28]
pRS316	Centromerischer <i>E. coli / S. cerevisiae</i> -Shuttle Vektor: amp ^R ori LacZα CEN6 ARSH4 URA3.	[91]

3.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
∆hog1/1	5'- ATG ACC ACT AAC GAG GAA TTC ATT AGG ACA CAG ATA TTC CAG CTG AAG CTT CGT ACG C -3'
∆hog1/2	5′- TTA CTG TTG GAA CTC ATT AGC GTA CTG TAT GGC CTG GTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G -3′
	(zur Deletion von <i>HOG1</i>)
∆pbs2/1	5'- ATG GAA GAC AAG TTT GCT AAC CTC AGT CTC CAT GAG AAA CAG CTG AAG CTT CGT ACG C -3'
∆pbs2/2	5´- CTA TAA ACC ACC CAT ATG TAA TGC CGG TAC ATT TTT AGA GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G -3´
	(zur Deletion von <i>PBS2</i>)
Pbs2 1065-1084 F	5'- ACG AGC AAA CAG GCT CAG AT-3'
Pbs2 3345-3364 R	5'- GTC AGC CCC GAA CGT AAA TA -3'
Kan 569-588 F	5'- GAT AAT GTC GGG CAA TCA G-3'
	(zur Kontrolle der Deletion von PBS2)
∆sho1/1	5′- ATG TCA ATA TCA AAG ATA AGA CCA ACT CCT CGT AAA CAG CTG AAG CTT CGT ACG C -3′
∆sho1/2	5'- TTA ACG ATG CAT TTC TTC TGG ACC ATC GAT TAG TTG AAC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G -3'
	(zur Deletion von SHO1)
∆ <i>sln1</i> /1	5'- ATG CGA TTT GGC GCT CCA TCA AAA TTG GAA CTC ACT CCT CAG CTG AAG CTT CGT ACG C -3'
∆sln1/2	5'- TCA TTT GTT ATT TTT CTT TCC CTG ATA TGC TGC ACA AAA GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G -3'
	(zur Deletion von <i>SLN1</i>)

Material und Methoden

3.1.4 Wachstumsmedien

Für die Herstellung der Wachstumsmedien wurde zweifach deionisiertes Wasser (ddH_2O) verwendet. Die Medien wurden zur Sterilisation für 20 min bei 121°C autoklaviert. Feste Medien (Agarplatten) enthielten zusätzlich jeweils zu den angegebenen Komponenten 2-3 % Bacto[®]-Agar. Alle Prozentangaben in diesem Abschnitt beziehen sich auf (w/v). Der pH-Wert der Medien wurde mit HCl oder NaOH eingestellt. Die Autophagie wurde durch Inkubation der Hefezellen in N-freiem SD(-N)-Medium oder durch Zugabe von 0,2 µg/ml Rapamycin zum Inkubationsmedium induziert. Hypoosmotisches Medium wurde durch Verdünnung von entsprechendem Inkubationsmedium mit sterilem Wasser hergestellt. Hyperosmolarität wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an NaCl, Raffinose, Sorbitol oder (NH₄)₂SO₄ eingestellt. Die Herstellung der verwendeten Inkubationsmedien ist in Tab. 4 angegeben. Die Osmolarität der Medien wurde mittels der Methode der Gefrierpunktserniedrigung mit einem Osmomat 030 der Firma Gonotec gemessen.

Inkubationsmedium	mosmol/L	Herstellung
SD(-N)	150	nach Standardprotokoll (Kapitel 3.1.5)
	30-60	Verdünnung von SD(-N)-Medium mit sterilem Wasser
	200-500	Zugabe von entsprechender Menge an NaCl (+200 mM*), Raffinose (+350 mM*), Sorbitol (+350 mM*) oder (NH ₄) ₂ SO ₄ (+10 mM*) zum SD(-N)-Medium
YPD	250	nach Standardprotokoll (Kapitel 3.1.5)
	30-150	Verdünnung von YPD-Medium mit sterilem Wasser
	300-500	Zugabe von entsprechender Menge an NaCl (+140 mM*) zum YPD-Medium
СМ	150	nach Standardprotokoll (Kapitel 3.1.5)
		* Angabe für 500 mosmol/L

Tab. 4: Herstellung der anisoosmolaren Inkubationsmedien bei verschiedenen Ausgangsmedien.
3.1.5 Medien für Hefekulturen

Vollmedium YPD, (pH 5,5)

- 1 % Hefeextrakt
- Bacto[®]-Pepton
- 2 % 2 % D-Glucose

Zusätzlich für YPD/Geniticin-Medium: 200 µg/ml Geniticin

YPD + Rapamycin

Wie YPD-Medium, jedoch mit zusätzlich 0,2 µg/ml Rapamycin

Synthetisches Vollmedium CM, (pH 5,6)

Yeast nitrogen base w/o amino acids
D-Glucose
L-Alanin
L-Arginin
L-Asparagin
L-Asparaginsäure
L-Cystein
L-Glutamin
L-Glutaminsäure
L-Glycin
L-Isoleucin
L-Methionin
L-Phenylalanin
L-Prolin
L-Serin
L-Threonin
L-Tyrosin
L-Valin
myo-Inosit
p-Aminobenzoesäure

Je nach Selektionsbedingungen wurden folgende Supplemente hinzugefügt:

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

CM + Rapamycin

Wie CM-Medium, jedoch mit zusätzlich 0,2 µg/ml Rapamycin

N-freies Medium SD(-N)

0,17 %	Yeast nitrogen base w/o amino acids and w/o
	ammoniumsulfate
2 %	D-Glucose

3.1.6 Medien für Escherichia coli-Kulturen

Vollmedium LB, (pH 7,5)

0,5 %	Hefeextrakt
1 %	Bacto [®] -Trypton
0,5 %	Natriumchlorid

Zusätzlich für LB_{Amp}-Medium: 75 µg/ml Ampicillin

• SOC-Medium, (pH 7,4)

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

3.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle
α -Aminopeptidase I, Kaninchen polyklonal	1:5000	Eurogentec, Köln
α-Atg13	1:5000	Eurogentec, Köln
α -GFP, Maus monoklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
α -PGK, Maus monoklonal	1:10000	Molecular Probes, Karlsruhe
α-Atg8	1:10000	[93]

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle
goat α -mouse IgG, Peroxidase konjugiert	1:5000 – 1:10000	Dianova, Hamburg
goat α -rabbit IgG, Peroxidase konjugiert	1:5000 – 1:10000	Caltag Laboratories, Hamburg

3.1.8 Enzyme

Enzyme	Quelle	
Restriktionsenzyme und Puffer RNase A Taq-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, UK Qiagen, Hilden Roche Diagnostics, Mannheim	

3.1.9 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden in der Qualität p.A. von Merck, Sigma Aldrich

oder Roth bezogen.

Quelle	Chemikalien
Alexis Biochemicals, Grünberg Applichem, Darmstadt Difco, Kansas City, USA Gibco, Karlsruhe Invitrogen GmbH, Karlsruhe Merck, Darmstadt Packard, Boston, USA Promega GmbH, Mannheim Roche Diagnostics, Mannheim Sigma Aldrich, München	Rapamycin 30 % Acrylamid (29:1) Reagenzien für Hefemedien und Platten Reagenzien für Bakterienmedien und Platten Geneticin [®] (G418) PMSF Ultima Gold (Szintillationsflüssigkeit) Heringssperma-DNA Protease Inhibitor Cocktail Tabletten Aminosäuren für die Hefekultivierung Ampicillin Aprotinin Benzamidin Leupeptin Pepstatin A

3.1.10 Kits

Quelle	Kits
Amersham, Little Chalfont, GB	ECL [™] Kit Gene Images [™] Random Prime DNA Labeling Kit
Qiagen, Hilden	QIAEX II Gel Extraction Kit QIAprep Spin Maxiprep Kit QIAprep Spin Miniprep Kit QIAquick PCR Purification Kit

3.1.11 Radioaktive Substanzen

Substanz	Aktivität	Quelle
L-[4,5- ³ H]Leucine	164 Ci/mmol	Amersham, Little Chalfont, GB

3.1.12 Geräte

Geräte	Quelle
Absaugsystem	HLC, Bovenden
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Densitometer, Image station 440 CF	Kodak, Stuttgart-Wangen
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	peQlab Biotechnologie, Erlgn.
Entwicklungsmaschine	Ágfa, Köln
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsofen	GFL, Großburgwedel
Inkubator 30°C	Memmert, Schwabach
Inkubator 37°C	Memmert, Schwabach
Laborschüttler für Kulturen, GFL 3031	GFL, Großburgwedel
Liquid Scintillation Analyser, TRI-CARB 2900TR	Packard, Boston, USA
Magnetrührer, IKA [®] RCT basic	IKA-Labortechnik, Lindau
Mikroskop, Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop, Axioskop 2 Plus	Zeiss, Oberkochen
Netzgerät, EPS 600	Amersham, Little Chalfont, GB
Netzgerät, P25	Biometra, Göttingen
Osmometer, Osmomat 030	Gonotec, Berlin
PCR-Maschine, PTC-200	Biozym, Hess. Oldendorf
pH-Meter, pH 330	WTW, Weilheim
Plattformschüttler, 3017	GFL, Großburgwedel
Protein-Gelelektrophorese-Apparatur, Protean II / III	Bio-Rad, Hercules, USA
Semidry-Blot-Apparatur, Multiphor II	Pharmacia, Piscataway, USA
Spektralphotometer, Ultrospec 2100 pro	Amersham, Little Chalfont, GB
Sterilbank	Welabo, Düsseldorf
Thermomixer, Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Sonifikator, TIG 250	Schöller & Co, Frankfurt a.M.
UV-Bestrahler	Camag, Berlin
Vibrax, VXR basic	IKA-Labortechnik, Lindau
Vortexer, L46	Labinco, Niederlande
Waage, PM 2000	Haake, Karlsruhe
Wasserbad	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge, Microfuge R	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge, AHT 35 R	Hettich, Mülheim a. d. Ruhr

Material und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Gegenständen

Hitzebeständige Geräte und Lösungen wurden bei 121°C und Überdruck für 30 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm-Filter, Nalgene, Neerijse, Belgien).

3.2.1.2 Allgemeine Wachstumsbedingungen

Zellkulturen in flüssigen Nährmedien wurden in Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben angesetzt, die mindestens das 5-fache Volumen der Nährflüssigkeit hatten, und auf einem Rundschüttler inkubiert. Hefekulturen wurden mit 150 Upm bei 30°C, *E. coli*-Kulturen mit 220 Upm bei 37°C inkubiert.

3.2.1.3 Dauerkulturen

Für Dauerkulturen von *S. cerevisiae* wurde eine Zahnstocherspitze Zellmaterial des jeweiligen Hefestammes direkt von einer Agarplatte entnommen, in 1 ml sterilem 15 %-igem Glycerin suspendiert und bei -80°C gelagert. Dauerkulturen von *E. coli* wurden durch Mischen von 500 µl einer Flüssigkultur mit 500 µl sterilem 60 %-igem Glycerin angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.4 Wachstumsbedingungen von Hefe

Flüssige Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern durch Beimpfen mittels einer Impföse hergestellt. Die Zellen wurden direkt von einer Agarplatte genommen, in 5 ml Nährmedium gegeben und bei 30°C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde die Vorkultur zum Anlegen einer Hauptkultur verwendet. Für plasmidtragende Hefestämme wurde CM-Medium (Kapitel 3.1.5) ohne die entsprechenden Auxotrophiemarker verwendet.

Hefekulturen auf Agarplatten benötigen bei 30°C eine Inkubationszeit von 2-4 Tagen. Anschließend konnten die Agarplatten bei 4°C bis zu sechs Wochen gelagert werden.

3.2.1.5 Zelldichte-Messung

Die Zelldichte von *S. cerevisiae* wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Außerhalb des linearen Bereiches des Photometers, ab einer $OD_{600} > 0,5$ wurden die Kulturen verdünnt. Verdünnungen wurden mit den entsprechenden Medien angesetzt. Als Referenz diente ebenfalls das entsprechende Medium. Eine errechnete optische Dichte von $OD_{600} = 1$ entspricht einer Zelldichte von 3×10^7 Zellen pro ml.

3.2.1.6 Wachstumsbedingungen von Escherichia coli

E. coli-Kulturen wurden direkt mit Zellen von Agarplatten oder aus Glycerinkulturen, die bei -80°C gelagert wurden, in LB-Medium (Kapitel 3.1.6) angeimpft und über Nacht inkubiert. Flüssigmedien und Agarplatten enthielten 75 µg/ml Ampicillin (LB_{Amp}-Flüssigmedium bzw. LB_{Amp}-Platten).

Material und Methoden

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Vorbehandlung von Glasperlen (Neutralisierung)

200 ml Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) wurden über Nacht in 10 M HCl unter Rühren gereinigt, mit 0,1 M TRIS/HCI-Lösung auf pH 7,5 äquilibriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

3.2.2.2 Isolierung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli

Zur Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das "QIAprep Spin Miniprep Kit" der Firma Qiagen nach dem entsprechenden Protokoll verwendet. Große Mengen Plasmid-DNA wurden nach dem entsprechenden Protokoll mit dem "QIAprep Spin Maxiprep Kit" der Firma Qiagen gewonnen. Zur Restiktionsanalyse wurden 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl geschnitten (Kapitel 3.2.2.4).

Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

1,5 ml Zellsuspension einer Hefe Über-Nacht-Kultur wurden 90 s bei 13000 Upm pelletiert und mit 1 ml Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl "breaking buffer" (100 mM NaCl; 10 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTA; 2 % (v/v) Triton X-100; 1 % (w/v) SDS) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform und von 200 µl neutralisierten Glasperlen, wurde die Mischung viermal für 1 min mittels eines Vortexers gemischt und dazwischen auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 200 µl Wasser und kurzem Mischen durch Invertieren, wurde die Probe 12 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml kaltem Ethanol (100 %) versetzt und dann gemischt. Nach zehnminütiger Fällung bei -20°C wurde erneut zentrifugiert (13000 Upm, 12 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl Wasser mit 30 µg RNase A [10 mg/ml RNase A (DNase-frei durch Erhitzen auf 100°C)] resuspendiert und zur RNA-Fällung 5 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden

1 ml kaltes Ethanol (100 %) und 10 µl einer 5 M Ammoniumacetat-Lösung zugegeben und mehrmals invertiert. Nach zehnminütiger DNA-Fällung bei -20°C, wurde 12 min bei 13000 Upm zentrifugiert und anschließend das Pellet mit kaltem Ethanol (70 %) gewaschen.

Die erhaltene DNA wurde bei 37°C getrocknet, in 20 µl Wasser resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Transformation

Herstellung kompetenter Escherichia coli-Zellen

Eine 600 ml LB-Hauptkultur wurde mit einer stationären Vorkultur des Stammes DH5α 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und 15-30 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (6500 Upm, 8 min, 4°C) und das Pellet unter Eiskühlung nacheinander mit 600 ml, 250 ml und abschließend mit 100 ml eiskaltem, sterilem 10 %-igem Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml 10 %-igem Glycerin aufgenommen, resuspendiert und in 40 μl-Aliquots bei -80°C gelagert.

Transformation von Escherichia coli

Ein Aliquot des *E. coli*-Stammes DH5 α wurde auf Eis aufgetaut, mit 10 µl der zu transformierenden DNA (1-50 ng) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis für 2 min abgekühlt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (Kapitel 3.1.6) 1 h bei 37°C inkubiert, auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode

Eine 10 ml Hauptkultur in YPD-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur 1:10 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 Upm, 5 min, 4°C) und zweimal mit 10 ml sterilem Wasser

und einmal mit 2,5 ml LiSorb-Puffer (100 mM Lithiumacetat; 1 mM EDTA; 1 M D-Sorbitol; 10 mM TRIS, (pH 7,5)) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl LiSorb-Puffer resuspendiert und 15 min bei 30°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und jeweils mit 300 µl PEG-Lösung (40 % (w/v) PEG 3350; 100 mM Lithiumacetat; 1 mM EDTA; 10 mM TRIS, (pH 7,5)) versetzt. 50 µg Heringssperma-DNA (stock: 10 mg/ml; durch zehnminütiges Kochen bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt) und 1-3 µg der zu transformierenden DNA wurden zugegeben und die Transformationsmischung für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 20 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden pelletiert (3000 Upm, 15 s), in 1 ml CM-Selektionsmedium aufgenommen und auf CM-Selektionsplatten ausplattiert (bei Selektion auf auxotrophe Marker).

Bei Selektion auf Geniticin-Resistenz wurden die Zellen zunächst in 1 ml YPD-Medium aufgenommen und 3 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde auf YPD/Geniticin-Platten ausplattiert und nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C nochmals auf YPD/Geniticin-Platten replika-plattiert.

"Quick-And-Dirty"-Transformation von Plasmiden in Hefezellen

Eine stecknadelkopfgroße Menge von Hefezellen wurde in 300 µl PEG-Lösung resuspendiert und wie in Kapitel 3.2.2.3 (Lithiumacetat-Methode) beschrieben transformiert.

3.2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

In einer Standardreaktion wurden 1 μ g DNA mit 2-5 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease(n) und 1 μ l 10-fach Restriktionspuffer versetzt und auf 10 μ l mit Wasser aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde 1-2 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 1 µl 10-fach DNA-Probenpuffer (pH 8,0; 1M TRIS/HCI; 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) abgebrochen und eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.2.5) durchgeführt.

Material und Methoden

3.2.2.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Einzelne DNA-Fragmente können durch Anlegen eines elektrischen Feldes in Agarosegelen aufgetrennt werden. Hierfür wurden DNA-Proben mit 10-fachem DNA-Probenpuffer (Kapitel 3.2.2.4) versetzt. In einer Flachbett-Elektrophorese-Kammer (peQlab Biotechnologie, Erlangen) wurden (je nach Größe der erwarteten Fragmente) 0,8 bis 2 %-ige Agarosegele verwendet, welche mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Die Elektrophorese erfolgte bei RT in TAE-Puffer (pH 7,5; 40 mM TRIS/Essigsäure; 2 mM EDTA) bei einer konstanten Spannung von 80-120 V. Als Längenstandard wurde der "SmartLadder" der Firma Eurogentec, Belgien verwendet. Nach der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht (302 nm) detektiert und zur Dokumentation photografiert.

3.2.2.6 Genaustausch durch homologe Rekombination

Gen-Deletionen in *S. cerevisiae* wurden durch homologe Rekombination von Markern in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt. Hierzu wurde die von Longtine [94] beschriebene, auf PCR basierende, Methode der Gendeletion benutzt. Es wurden 60mere Oligonukleotide (Kapitel 3.1.3) verwendet, deren zwanzig 3'-ständigen Basen die Amplifikation eines Selektionsmarkers (Kanamycin-Resistenzgen) erlauben, der auf einem Plasmid (pUG6; Kapitel 3.1.2) vorliegt. Die vierzig 5'-ständigen Basen sind genspezifisch und erlauben die homologe Rekombination. Der Erfolg der Genmanipulationen wurde durch eine Southern-Blot-Analyse (Kapitel 3.2.2.10) verifiziert.

3.2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein Standard PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- je 1 µl beider Primer (100 pmol/µl)
 - 1 µl "template" (Plasmid-DNA oder chromosomale DNA)
 - 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
 - 5 µl 10-fach PCR-Puffer
 - 1 µl Magnesiumsulfat (100 mM)
 - 40 µl H₂O
 - 1 μl Taq-Polymerase (2 U/μl)

Die jeweiligen Abweichungen vom Standard PCR-Ansatz sind im Folgenden angegeben. Bei veränderten Mengen wurde die Wassermenge entsprechend angepasst.

Folgende PCR-Programme wurden im Einzelnen verwendet:

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/ DNA-Synthese
1 x	6 min 95°C	40 s 54°C	4 min 72°C
25 x	40 s 95°C	40 s 54°C	4 min 72°C
1 x	40 s 95°C	40 s 54°C	5 min 72°C

Tab. 5: PCR-Programm zur Herstellung der knockout-Kassette aus pUG6.

Mit diesem Programm wurde jeweils die *knockout*-Kassette für *die HOG1-*, *PBS2-*, *SLN1-* und *SHO1-*Deletion erzeugt, mit welcher diese Gene chromosomal gegen das Kanamycin-Resistenzgen ausgetauscht werden können (Tab. 5). Als Primer wurden die entsprechenden Oligonukleotide (Kapitel 3.1.3) verwendet und als "template" das Plasmid pUG6 (Kapitel 3.1.2).

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/ DNA-Synthese
1 x	60 s 94°C		
30 x	30 s 50°C	4 min 72°C	30 s 94°C
1 x	10 min 72°C		

Tab. 6: PCR-Programm 1 zur Kontrolle der PBS2-Disruption.

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/ DNA-Synthese
1 x	60 s 94°C		
30 x	30 s 55°C	150 s72°C	30 s 94°C
1 x	10 min 72°C		

Tab. 7: PCR-Programm 2 zur Kontrolle der PBS2-Disruption.

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/ DNA-Synthese
1 x	60 s 94°C		
30 x	30 s 50°C	150 s72°C	30 s 94°C
1 x	10 min 72°C		

Tab. 8: PCR-Programm 3 zur Kontrolle der PBS2-Disruption.

Mit diesen drei Programmen sollte die Disruption von *PBS2* gegen die *knockout*-Kassette kontrolliert werden (Tab. 6-8). Als Primer wurden die entsprechenden Oligonukleotide (Kapitel 3.1.3) verwendet und als "template" chromosomale DNA (Kapitel 3.2.2.2) der potentiellen *pbs2* Δ -Klone.

3.2.2.8 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" der Firma Qiagen nach Firmenvorschrift gereinigt.

3.2.2.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Vergleich der Bandenstärke mit dem jeweils verwendeten Konzentrationsstandard in einem Agarosegel (Kapitel 3.2.2.5) bestimmt.

3.2.2.10 Southern-Blot-Analyse

Die Identifizierung chromosomaler DNA-Fragmente mittels Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden wurde nach dem Southern-Blot-Verfahren [95] durchgeführt. Hierbei wurde chromosomale DNA (Kapitel 3.2.2.2) mit Restriktionsendonukleasen verdaut (Kapitel 3.2.2.4), die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 3.2.2.5), auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Sonden detektiert (Kapitel 3.2.2.10).

Herstellung markierter Sonden

Die DNA-Sonden wurden mit Hilfe des "Gene Images[™] Random Prime Labeling Kit" der Firma Amersham (Little Chalfont, GB) nach Protokoll hergestellt.

Auftrennung der DNA-Fragmente

Die isolierte chromosomale DNA der zu untersuchenden Hefestämme (Kapitel 3.2.2.2) wurde über Nacht in einem 20 µl Ansatz mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (Kapitel 3.2.2.4) und dann mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.2.5) aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht mit einem Lineal (als Längenvergleich) photografiert und dokumentiert.

DNA-Transfer (Kapillar-Blot-Verfahren)

Das Gel wurde zuerst zweimal für 8 min in Acid-Nicking-Puffer (250 mM HCl), dann für 15 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 500 mM NaOH) und abschließend für 1 h in Neutralisierungspuffer (pH 7,0; 3 M NaCl; 500 mM TRIS/HCl) unter leichtem Schütteln gewaschen. Während dieser Zeit wurde sowohl eine Hybond[™]-N Nylonmembran als auch Filterpapier GB 003 auf die Größe des Gels zugeschnitten und anschließend die Membran und ¼ der zugeschnittenen Filterpapiere in 6-fach-SSC-Puffer getränkt.

Danach wurde die Blotting-Apparatur nach Skizze (Abb. 7) zusammengebaut und die DNA über Nacht mit 6-fachem SSC-Puffer transferiert. Anschließend wurde der Stapel zerlegt und die DNA durch fünfminütiges Bestrahlen mit UV-Licht auf der Membran fixiert.

Zusammensetzung des SSC-Puffers, (pH 7,0) (20-fach):

3 M Natriumchlorid 300 mM Natriumcitrat



Material und Methoden

Hybridisierung und Detektion

Hybridisierung und Detektion der Membran wurde nach Vorschrift des "Gene Images[™] Random Prime Labeling Kit" der Firma Amersham (Little Chalfont, GB) durchgeführt. Die Membran mit der fixierten DNA wurde in einer Hybridisierungsröhre für 3-5 h bei 60°C mit 30 ml Hybridisierungspuffer (5-fach SSC-Puffer; 0,1 % (w/v) SDS; 5 % (w/v) Dextransulfat; 5 % (w/v) Liquid Block) vorhvbridisiert und anschließend mit der DNA-Sonde über Nacht bei 60°C inkubiert. Danach wurde die Membran je 15 min bei 60°C in 1-fachem SSC-Puffer mit 0,1 % (w/v) SDS und anschließend in 0,5-fachem SSC-Puffer mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Nach kurzem Spülen (5 min, RT) mit Diluent-Puffer (pH 9,5; steril; 300 mM NaCl; 100 mM TRIS/HCl) wurden freie Bindungsstellen der Membran mit 50 ml 10 % (v/v) Liquid-Block in Diluent-Puffer (1 h, RT) abgesättigt. Danach wurde erneut kurz mit Diluent-Puffer gespült. Durch Zugabe von 18 ml einer Lösung Anti-Fluorescin-AP-Konjugat (1:5000 in Diluent-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA) wurde die DNA-Sonde immunologisch detektiert (1 h, RT). Überschüssiges Konjugat wurde anschließend durch dreimaliges, ie zehnminütiges Waschen der Membran mit je 150 ml 0,3 % (v/v) Tween 20 in Diluent-Puffer entfernt.

Zur Detektion wurde die Membran für 2-5 min mit 2,5 ml "Detection Reagenz" inkubiert. Nach Entfernen von überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran luftdicht in eine Plastiktasche eingeschlossen. Danach wurde ein Hyperfilm[™] ECL-Film (Amersham, Little Chalfont, GB) für 10 s bis zu 30 min aufgelegt und anschließend entwickelt.

3.2.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 230 bis 280 nm bestimmt, wobei eine E_{260} von 1 einer Konzentration von 50 ng/µl bei doppelsträngiger DNA entspricht [96]. Die Reinheit wurde mittels der Quotienten E_{260}/E_{280} (Protein-Verunreinigung) und E_{260}/E_{230} (Kohlenhydrat-Verunreinigung) kontrolliert, welche zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten.

3.2.3 Zellbiologische und biochemische Methoden

3.2.3.1 Vesikeltest (Test auf Akkumulation autophagischer Vesikel)

Der Vesikeltest wird verwendet, um viele Stämme schnell auf Defekte bezüglich der Autophagie zu untersuchen. 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in YPD wurden 3 min bei 2500 Upm abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml 1 %-iger Kaliumacetatlösung gewaschen und anschließend in 1 ml 1 %-iger Kaliumacetatlösung mit 1 mM PMSF für 4 h bei 30°C unter Schütteln gehungert. Das N-freie Inkubationsmedium wurde durch Zugabe einer frisch zubereiteten Stocklösung aus 10,8 mg PMSF und 750 µl Ethanol in 45 ml 1 %-iger Acetatlösung hergestellt. Die gehungerten Zellen wurden im Mikroskop im differentiellen Interferenzkontrast nach Nomarski auf autophagische Vesikel in der Vakuole untersucht.

3.2.3.2 Untersuchung auf Vitalität bei anisoosmotischer Inkubation

Die zu testenden Hefestämme wurden aus einer stationären Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert (die verwendeten Inkubationsmedien und die Versuchsbedingungen sind in Tab. 9 angegeben). Zellen mit einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 wurden 1:1000 in 1 ml sterilem Wasser verdünnt und davon 10 μ l (Endverdünnung 1:100000) auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Zellen wurden stündlich für mindestens 4 h weitere Proben entnommen. Die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien konnten nach zwei Tagen ausgezählt werden.

Inkubationsmedium	Versuchsbedingungen	mosmol/L
SD(-N)	normoosmotisch	150
	hypoosmotisch	30-60
	hyperosmotisch	200-500
YPD	normoosmotisch	250
CMura	normoosmotisch	150

Tab. 9: Verwendete Inkubationsmedien und Versuchsbedingungen.

Material und Methoden

3.2.3.3 Kernfärbung mit Methylenblau (Vitalfärbung von Hefezellen)

Zur Ermittlung des Anteils an lebenden Zellen wurden Hefen in Flüssigkultur mit einer 0,1 %-igen Methylenblaulösung nach Löffler (Merck 13, 6085) für 10 min bei RT inkubiert und anschließend ca. 3 µl Zellsuspension zwischen eine Neubauer-Kammer gegeben und mittels eines Durchlichtmikroskops ausgezählt.

3.2.3.4 Osmosensitivitätsassay

Um die Osmosensitivität der verwendeten Hefestämme nachweisen zu können, wurden jeweils Zellen auf Vollmedium-Platten (YPD; 250 mosmol/L) und auf Agarplatten mit zusätzlich 0,1 M NaCl (450 mosmol/L) und 0,5 M NaCl (1400 mosmol/L) aufgetropft und für drei Tage bei 30°C angezogen. Als Positivkontrolle wurden WT-Zellen verwendet, die eine hohe Toleranz in Bezug auf osmotischen Stress aufweisen.

3.2.4 Proteinchemische Methoden

3.2.4.1 Herstellung von Proteinrohextrakten mittels alkalischer Lyse von Hefezellen

In Anlehnung an Yaffe und Schatz [97] wurde diese Aufschlussmethode von Hefezellen durchgeführt. Eine OD_{600} -Einheit Zellen (Kapitel 3.2.1.5) wurde abzentrifugiert (13000 Upm, 2 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Wasser resuspendiert und 150 µl Lyselösung (1,85 M NaOH; 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) hinzugegeben. Danach wurde für 10 min auf Eis unter mehrmaligem Mischen inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 50 %-ige (w/v) TCA zugegeben, gemischt und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit kaltem Aceton gewaschen und in 50 µl Harnstoff-Puffer (pH 6,8; 8 M Harnstoff; 140 mM TRIS/HCI; 0,1 mM EDTA; 5 % (w/v) SDS; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Zum Lösen der Pellets wurden die Proben für 30 min auf einem Multivortexer (IKA-Vibrax) bei RT gerüttelt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 2 min bei 13000 Upm

zentrifugiert. Bei der SDS-Gelektrophorese (Kapitel 3.2.4.2) wurden jeweils 10 µl Probe pro Spur aufgetragen.

Die Proben konnten zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

3.2.4.2 <u>SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese</u> (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli [98] in einer "Mini-Protean II / III"-Elektrophoresekammer (BioRad, Hercules, USA) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "Precision Plus Protein[™] Standard, Dual Color" der Firma BioRad eingesetzt.

	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel
	0	4.7	0.4 ml
H ₂ O	8 mi	4,7 mi	6,1 MI
1,5 M TRIS, (pH 8,8)	5 ml	5 ml	-
0,5 M TRIS, (pH 6,8)	-	-	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	200 µl	200 µl	100 µl
Acrylamid 29:1	6,7 ml	10,05 ml	1,3 ml
10 % (w/v) APS	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	10 µI	10 µl	10 µl

Tab. 10: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (für vier Gele).

Das Trenn- und Sammelgel wurden jeweils frisch zubereitet (Tab. 10) und nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und TEMED sofort zwischen die Glasplatten der zusammengebauten Elektrophorese-Apparatur eingefüllt. Pro Gel wurden zunächst ca. 5 ml Trenngel eingefüllt und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Isopropanol abgegossen und mit Wasser rückstandsfrei aus dem Glasplattenzwischenraum herausgewaschen. Danach wurde die Apparatur mit 1-2 ml Sammelgel aufgefüllt und der Kamm eingesetzt.

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde die Laufkammer mit ca. 800 ml Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS; 200 mM L-Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt und je 10 µl der Proteinrohextrakte gegen 4 µl Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.4.3 Western-Blot

Proteintransfer auf eine Membran

Proteine in einem Polyacrylamidgel wurden mit Hilfe einer Semidry-Blot-Apparatur nach der Methode von Towbin [99] auf eine PVDF-Membran (Pall Corporation, Pensacola, Florida, USA) transferiert.

Auf die Kathodenseite der Blot-Apparatur wurden fünf Lagen Filterpapier GB 002 (Schleicher & Schüll, Dassel), das Polyacrylamidgel (aus Kapitel 3.2.4.2, ohne Sammelgel), eine PVDF-Membran und erneut fünf Lagen Filterpapier übereinander gestapelt. Filterpapier und PVDF-Membran (vorher mit Methanol aktiviert) wurden vorher mit Blotting-Puffer (150 mM L-Glycin; 20 mM TRIS; 20 % (v/v) Methanol) getränkt. Nachdem die Luftblasen aus dem Stapel entfernt worden waren, wurde der Anodendeckel aufgelegt, die Blot-Apparatur geschlossen und mit einem Gewicht beschwert. Der Proteintransfer auf die Membran wurde für 90 min bei 45 mA pro Gel durchgeführt.

Immunologischer Nachweis von Proteinen

Proteinhaltige PVDF-Membranen wurden bis zum immunologischen Nachweis der Proteine in TBST-Puffer (pH 7,6; 20 mM TRIS/HCI; 137 mM NaCI; 0,1 % (v/v) Tween 20) bei 4°C gelagert. Alle nachfolgenden Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei RT auf einem Schüttler durchgeführt.

Zum Absättigen freier Bindungsstellen auf der Membran wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder mindestens 1 h bei RT in 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde mit mindestens 12,5 ml des entsprechend verdünnten Erstantikörpers in TBST-Puffer (die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind in Kapitel 3.1.7 angegeben) für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem zehnminütigem Waschen mit TBST-Puffer wurde für 1 h mit mindestens 12,5 ml des entsprechend verdünnten Sekundärantikörpers in TBST-Puffer % Magermilchpulver (bei PGK-Färbungen mit 1 (w/v) ohne Magermilchpulver) inkubiert (für die verwendeten Verdünnungen siehe Kapitel 3.1.7). Danach wurde die Membran nochmals dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen.

Die Antikörperbanden wurden abschließend mittels des ECL[™]-Detektionssystems der Firma Amersham (Little Chalfont, GB) nach Protokoll detektiert.

Bevor weitere immunologische Nachweise vorgenommen werden konnten, mussten die Antikörper wieder von den Membranen entfernt werden. Dazu wurden die PVDF-Membranen für 8 min in 10 %-iger Essigsäure inkubiert und anschließend mindestens dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Dann wurden die Membranen über Nacht bei 4°C oder mindestens 1 h bei RT in TBST-Puffer mit 10 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Anschließend konnte mit dem immunologischen Nachweis, wie in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben, fortgefahren werden.

Das Fusionsprotein GFP-Atg8 als Marker für die Autophagieaktivität

Das Hefeprotein Atg8 ist eine essentiell am Prozess der Autophagie beteiligte Komponente (Kapitel 1.2). Unter Verwendung des zentromerischen Plasmids pGFP-N/*ATG8* (Kapitel 3.1.2), welches für ein Fusionsprotein von GFP und Atg8 kodiert, ist es möglich, autophagische Vesikel in transformierten Hefezellen während der Induktion der Autophagie zu untersuchen. Das Fusionsprotein GFP-Atg8 steht unter Kontrolle des natürlichen *ATG8*-Promotors und ist durch Induktion der Autophagie mittels Inkubation in N-freiem Medium oder durch Zugabe von Rapamycin induzierbar.



Durch das Autophagie-spezifische GFP-markierte Protein Atg8 kann der Transport von GFP-Atg8 in die Vakuole direkt im Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Mittels Degradation von GFP-Atg8 via Autophagie kann im Western Blot die Autophagieaktivität über GFP-Antikörper bestimmt werden.

3.2.4.4 Bestimmung der GFP-Atg8-Degradation

GFP-Atg8-exprimierende Zellen (siehe Abb. 8) wurden bis zur frühstationären Phase in Selektionsmedium (CMura⁻) angezogen. Nachdem die optische Dichte der Zellkultur bestimmt worden war (Kapitel 3.2.1.5), wurde 1 OD₆₀₀-Einheit Zellen für die Nullpunkt-Kontrolle entnommen, abzentrifugiert (13000 Upm, 2 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zum weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die restliche Zellsuspension wurde pelletiert (3000 Upm, 5 min, RT) und zweimal gewaschen. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in Inkubationsmedien mit verschiedenen Versuchsbedingungen überführt (die verwendeten Inkubationsmedien und ihre Versuchsbedingungen sind in Tab. 11 angegeben) und für 4 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Autophagie konnte durch Inkubationsmedium erfolgen.

Stündlich wurden weitere 1 OD₆₀₀-Einheiten Zellen entnommen, abzentrifugiert und das Zellpellet bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der GFP-Atg8-Degradation wurden Proteinrohextrakte hergestellt (Kapitel 3.2.4.1), diese auf 10 %-igen SDS-Gelen aufgetrennt (Kapitel 3.2.4.2) und auf PVDF-Membran transferiert. Das GFP-Fusionsprotein und freies GFP wurden mit GFP-Antikörpern detektiert (Kapitel 3.2.4.3) und anschließend densitometrisch analysiert. Abschließend wurden die Membranen zur Ladekontrolle mit PGK-Antikörpern detektiert und densitometrisch ausgewertet.

Inkubationsmedium	Versuchsbedingungen	weitere Zusätze
SD(-N)	normoosmotisch 150 mosmol/L hypoosmotisch 30-60 mosmol/L hyperosmotisch 200-500 mosmol/L	
SD(-N)	150 mosmol/L	5 mM NH₄Cl 2 mM Phenylalanin SB 203580 (1 und 10 µM) SB 202190 (10 µM) PD 169316 (10 µM)
CMura + 0,2 μg/ml Rapamycin	150 mosmol/L	5 mM NH₄Cl 2 mM Phenylalanin

Tab. 11: Verwendete Inkubationsmedien und Versuchsbedingungen.

Material und Methoden

3.2.4.5 Bestimmung des Lipidierungsstatus von Atg8

Zur Bestimmung des Lipidierungsstatus von Atg8 während osmotischem Stress wurden WT-, *hog1*∆- und *atg8*∆-Zellen bis zur frühstationären Phase in Vollmedium angezogen. Zur näheren Untersuchung der Lipidierung von Atg8 wurde wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben, verfahren. Die Auftrennung der Proteinrohextrakte erfolgte mit Hilfe von 15 %-igen SDS-Gelen mit Zusatz von 6 M Harnstoff (Kapitel 3.2.4.2). Atg8 und die lipidierte Form von Atg8 (Atg8-PE) konnten mittels eines Atg8-Antikörpers detektiert werden (Kapitel 3.2.4.3).

3.2.4.6 Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von Atg13

Für die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Atg13 während osmotischem Stress wurden WT- und $hog1\Delta$ -Zellen, die Atg13 überexprimieren, bis zur frühstationären Phase in Selektionsmedium (CMura⁻) und $atg13\Delta$ -Zellen in Vollmedium angezogen. Wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben wurden die Zellen in N-Hungermedium mit den zu untersuchenden Osmolaritäten für die angegebenen Zeiträume gehungert. Stündlich wurden 5 OD₆₀₀-Einheiten Zellen entnommen, die Zellpellets sofort in Lysepuffer resuspendiert, 100 µl Glasperlen hinzugegeben und die Zellen für 30 min und 4°C bei heftigem Rütteln auf dem Multivortexer (IKA-Vibrax) aufgebrochen. Die Zelllysate wurden pelletiert (3000 Upm, 10 min, 4°C) und die Überstände in neuen Reaktionsgefäßen gesammelt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die gesammelten Überstände für eine Western-Blot-Analyse mit Lämmli-Puffer versetzt (Kapitel 3.2.4.1) und die Proteinextrakte auf 10 %-igen SDS-Gelen aufgetrennt (Kapitel 3.2.4.2). Die unterschiedlich phosphorylierten Atg13-Formen wurden mit Hilfe von Atg13-Antikörpern (Kapitel 3.1.7) und die Ladekontrolle mit PGK-Antikörpern detektiert (Kapitel 3.2.4.3).

Zusammensetzung des Lysepuffers, (pH 7,4):

1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
2 mM	Natriumorthovanadat
50 mM	KF
15 mM	Natriumphyrophosphat
15 mM	p-Nitrophenylphosphat
20 µg/ml	Leupeptin
20 µg/ml	Benzamidin
10 µg/ml	Pepstatin A
40 µg/ml	Aprotinin
1 mM	PMSF
0,5 %	Tween 20
1 x	Protease Inhibitor Cocktail Tablette
	(Roche, Mannheim)

3.2.4.7 Bestimmung der Proteolyserate

In-Vivo-Markierung von Hefeproteinen

Die Proteolyserate wurde in Anlehnung an die Methode von Takeshige [15] bestimmt.

Aus einer stationären YPD-Vorkultur wurde eine Hauptkultur so angeimpft, dass die Kultur nach 16 h bei 30°C unter Schütteln eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 aufwies. Die Hauptkultur wurde mit YPD-Medium angesetzt, dem 1 μ Ci/ml L-4,5-[³H]-Leucin zugegeben wurde. Bevor die Zellen zweimal in SD(-N)-Medium oder YPD-Medium (je nach Versuchsaufbau) gewaschen wurden (3000 Upm, 5 min, RT), wurde 1 OD₆₀₀-Einheit Zellen als Nullpunkt-Kontrolle entnommen und die Zellen vom Überstand durch Zentrifugation getrennt (13000 Upm, 2 min, RT). Jeweils 500 μ l des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellpellets und der Überstand wurden bis zum Ende des Versuches bei -20°C gelagert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese im entsprechenden Inkubationsmedium (Tab. 12) resuspendiert und für 4 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Stündlich wurde aus der Flüssigkultur 1 OD₆₀₀-Einheit Zellen entnommen und die Zellen vom Überstand durch Zeuten vom Überstand durch Zeuten (13000 Ipm, 2 min, RT).

Upm, 2 min, RT). Wiederum wurden jeweils 500 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Zellpellets und Überstände bis zum Ende des Versuches bei -20°C gelagert. Nach Abschluss des Versuches wurden die gesammelten Proben bis zum Zellaufschluss bei -80°C gelagert.

Inkubationsmedium	Versuchsbedingungen	weitere Zusätze
SD(-N)	normoosmotisch 150 mosmol/L hypoosmotisch 30 mosmol/L hyperosmotisch 500 mosmol/L	
YPD	150 mosmol/L	5 mM NH₄Cl 2 mM Phenylalanin
YPD + 0,2 µg/ml Rapamycin	150 mosmol/L	5 mM NH₄Cl 2 mM Phenylalanin

Tab. 12: Verwendete Inkubationsmedien und Versuchsbedingungen.

Für den Zellaufschluss wurden die Proben wieder aufgetaut und die Zellpellets in 1 ml Wasser resuspendiert. Nach einer einminütigen Ultraschallbehandlung der Proben wurde jeweils 200 µl 50 %-ige (w/v) TCA zugegeben und nach kurzem Mischen für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min, RT) und jeweils 500 µl des Überstandes in einem neuen Der restliche Überstand Reaktionsgefäß gesammelt. wurde verworfen. Anschließend wurden die TCA-Pellets in 1 ml Wasser resuspendiert. Die Überstände und die **TCA-Pellets** für gesammelten wurden die Szintillationsmessung jeweils in entsprechende Reaktionsgefäße (vials, Packard, USA) mit Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, USA) gegeben und nach 30 s Mischen mindestens 3 h ruhen gelassen. Danach wurde eine Szintillationszählung im TRI-CARB 2900TR (Packard, USA) für 4 min durchgeführt.

Die gemessene Radioaktivität im Überstand der Zellen wurde in Bezug zur Gesamtradioaktivität gesetzt und als fraktionelle Radioaktivität (Radioaktivität im Überstand/Gesamtaktivität) in % pro Zeiteinheit angegeben. Die Summe der intraund extrazellulären Radioaktivität zu den untersuchten Zeitpunkten wurde hierbei als 100 % festgesetzt.

3.2.4.8 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit der AxioCam der Firma Zeiss und der Kamera Software "AxioVision" aufgenommen und mit dem Programm "Adobe Photoshop 7.0" nachbearbeitet. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem FITC-Filtersatz beobachtet.

Atg8- / Atg9-Fluoreszenzmikroskopie

GFP-Atg8- oder GFP-Atg9-exprimierende Zellen wurden bis zur frühstationären Phase in Selektionsmedium (CMura⁻) angezogen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde abzentrifugiert (3000 Upm, 1 min, RT) und zweimal mit SD(-N) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in normo- (150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) N-freiem Inkubationsmedium resuspendiert. Es wurden jeweils 1 mM PMSF hinzugegeben und die Zellen für 4 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Nomarskioptik betrachtet.

3.2.4.9 Statistische Verfahren und graphische Darstellung

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*) angegeben. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um den Gewohnheiten der Journale (*Biochemical Journal* und *Autophagy*), in denen diese Daten veröffentlicht wurden, entgegen zu kommen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt (n = Anzahl der unabhängigen Versuche). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student-*t*-Test berechnet. Eine Signifikanz wurde als signifikant angenommen, bei einem *p*-Wert < 0,05. Die jeweiligen *p*-Werte wurden in den graphischen Darstellungen oder Statistiken aufgeführt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes "GraphPad Prism 4" (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

IV Ergebnisse

Werden Hefezellen einem hyperosmotischen Medium ausgesetzt, stoppt das Zellwachstum, die Konzentration des Aktinzytoskeletts vermindert sich, die Proteinsynthese wird gehemmt und die Konzentration von intrazellulären Makromolekülen steigt an [51]. Ein Großteil dieser Zellantwort wird bei Hyperosmolarität durch Aktivierung von Hog1 ausgeglichen [63, 64] (siehe auch Kapitel 1.4.1).

4.1 Die Deletion von *HOG1* führt zu Osmosensitivität in Hefe

Um die Auswirkungen der *HOG1*-Deletion auf die Vitalität der Hefe *S. cerevisiae in vivo* zu untersuchen, wurde ein Osmosensitivitätsassay (Kapitel 3.2.3.4) an WTund *hog1* Δ -Zellen vorgenommen, bei dem die Zellen hyperosmotischem Stress unterschiedlicher Osmolarität ausgesetzt wurden.



Abb. 9: Untersuchung von *hog1*∆-Zellen auf Osmosensitivität bei hyperosmotischer Exposition.

Die Zellen wurden in Vollmedium angezogen und in drei Verdünnungen, jeweils 1:100 von oben nach unten, auf Agarplatten mit unterschiedlichen hyperosmotischen Bedingungen getropft. Gezeigt ist das Wachstum des Wildtypstammes im Vergleich zu dem des *HOG1*-Disruptionsstammes. Die Zellen wurden zum einen auf Vollmedium-Platten (YPD; 250 mosmol/L) und zum anderen auf Platten mit zusätzlich 0,1 M NaCI (450 mosmol/L) und 0,5 M NaCI (1400 mosmol/L) für drei Tage bei 30°C angezogen.

Ergebnisse

Die Deletion von *HOG1* führt zur Osmosensitivität der Hefezellen, was durch eine signifikant verringerte Vitalität der *hog1*∆-Zellen bei Zugabe von 0,5 M NaCl zum YPD-Vollmedium (1400 mosmol/L) sichtbar wurde (Abb. 9, rechts unten). WT-Zellen wiesen hingegen bei Zugabe von 0,5 M NaCl keinen sichtbaren Vitalitätsverlust auf. Folglich lag für *hog1*∆-Zellen bei einer Osmolarität von mehr als 450 mosmol/L letaler osmotischer Stress vor, den wildtypische Zellen jedoch tolerieren konnten. Im hyperosmotischen Bereich von 250 bis 450 mosmol/L schien für beide Hefestämme nicht-letaler osmotischer Stress vorzuliegen. Es wurden bisher kaum Untersuchungen zur Beziehung zwischen dem Ausmaß

der Hyperosmolarität und der Vitalität von Hefezellen vorgenommen [100, 101]. Fast alle Arbeiten verwenden sehr hohe extrazelluläre Osmolaritäten [102-104] (siehe auch Kapitel 4.1.4).

4.1.1 Die Reifung der Aminopeptidase I ist in *hog1*Δ-Zellen normal

Die Aminopeptidase I (API) ist eine vakuoläre Proteinase, die unabhängig vom sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert und dort gereift wird [1]. Alle *Aut*-Mutanten außer den *aut*6 Δ - und *aut*4 Δ -Deletionsstämmen sind nicht mehr zur Reifung der Proaminopeptidase I (proAPI) in der Lage [87, 105, 106]. Die Reifung der proAPI ist an ihrem verminderten Molekulargewicht, 45 kDa (mAPI: 51 kDa im SDS-GeI) statt 57 kDa (proAPI: 60 kDa im SDS-GeI) erkennbar. Um zu untersuchen, inwieweit intrazelluläre Transportmechanismen in osmosensitiven Zellen (*hog*1 Δ) beeinflusst sind, wurde der *HOG*1-Deletionsstamm auf einen Defekt in der Reifung der Aminopeptidase I mittels Immunoblot (Kapitel 3.2.4.1 bis 3.2.4.3) untersucht. Es wurden stationäre und frühstationäre Zellen der Stämme WT, *hog*1 Δ und *pep*4 Δ (als Negativkontrolle) verwendet. Die API wurde mit einem polyklonalen Peptidantikörper detektiert (Abb. 10).



Abb. 10: Untersuchung von *hog1* Δ -Zellen auf Defekte beim Cvt-Weg und der Autophagie. Die verwendeten Hefezellen wurden entweder bis zu frühstationären Phase in Vollmedium angezogen und dann für 4 h in normoosmotischem N-freiem Medium [SD(-N), 150 mosmol/L] (Spur 2, 5, 8) oder hypoosmotischem SD(-N)-Medium [30 mosmol/L] (Spur 3, 6, 9) gehungert oder bis zum Erreichen der stationären Phase in Vollmedium [250 mosmol/L] belassen (Spur 1, 4, 7). Gezeigt ist die Reifung der API im Wildtypstamm im Vergleich zum *HOG1*-Disruptionsstamm. Als Negativkontrolle wurde der Stamm *pep4* Δ (*Aut*-Mutante) verwendet, der nicht zur API-Reifung fähig ist. Es wurde ein repräsentativer Blot aus n = 3 Versuchen dargestellt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass unter nährstoffreichen Bedingungen die Proaminopeptidase I (proAPI) konstitutiv über den Cvt-Weg zur Vakuole transportiert wird, während unter Hungerbedingungen der vesikuläre Transport der Autophagie überwiegt [24, 25]. WT- und *hog1*∆-Zellen, die bis zum Erreichen der stationären Phase in Vollmedium (250 mosmol/L) belassen wurden zeigten gereifte Aminopeptidase I (Abb. 10, Spur 4 und 7). Folglich wurde unter nährstoffreichen, wenn auch leicht hyperosmotischen Bedingungen die API via Cvt-Weg normal gereift.

HOG1-deletierte Zellen zeigten im direkten Vergleich mit WT-Zellen auch bei Inkubation in N-freiem Medium eine normale Reifung der API (Abb. 10, Spur 8 und 9). Dieses Ergebnis macht einerseits deutlich, dass Hog1 nicht essentiell für die Reifung der Aminopeptidase I via Cvt-Weg war und, dass eine hypoosmotische Inkubation keinen Einfluss auf die Reifung der Aminopeptidase I hatte (Abb. 10, Spur 9). Die *Aut*-Mutante *pep4* Δ zeigte während keiner untersuchten Bedingung eine Reifung der API. Hyperosmotische Bedingungen wurden nicht untersucht. Ergebnisse

4.1.2 Die Bildung autophagischer Vesikel wird durch N-Mangel induziert

Um zu überprüfen, ob Hog1 essentiell am Mechanismus der Autophagie beteiligt ist, wurde ein Vesikeltest (Kapitel 3.2.3.1) mit dem *HOG1*-Deletionsstamm durchgeführt.

Bei Induktion der Autophagie reichern sich in Proteinase-B-defizienten Stämmen Vesikel in der Vakuole an. Die Verwendung des Proteinase-B-Inhibitors PMSF führt auch in WT-Zellen zu einer Akkumulation von autophagischen Vesikeln innerhalb der Vakuole (Kapitel 1.2). *Aut*-Mutanten (außer den Lysemutanten *aut*5 Δ und *aut*4 Δ) weisen unter den beschriebenen Bedingungen keine Vesikel in ihrer Vakuole auf. Sie sind nicht in der Lage Vesikel zu bilden oder zu transportieren [107].



Abb. 11: Untersuchung von hog1∆-Zellen auf defizitäre Vesikelbildung.

Stationäre Zellen der Stämme WT und $hog1\Delta$ wurden mit 1 %-iger Kaliumacetatlösung gewaschen und für 4 h in 1 %-iger Kaliumacetatlösung und zusätzlich 1 mM PMSF, bei 30°C inkubiert (Kapitel 3.2.3.1). Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit Nomarskioptik betrachtet. Repräsentative Abbildungen aus n = 3 Experimenten wurden dargestellt.

Die *hog1*∆-Zellen verhielten sich bei Induktion der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium wie WT-Zellen. Bei Zugabe von PMSF konnte hier deutlich eine Akkumulation autophagischer Vesikel in der Vakuole beobachtet werden. Der *HOG1*-Deletionsstamm wies keinen Defekt in der Bildung von autophagischen Vesikeln, sowie ihrem Transport zur Vakuole auf. Daraus kann geschlossen werden, dass Hog1 unter normoosmotischen Bedingungen nicht essentiell für die Autophagie ist.

4.1.3 Bei osmotischem Stress weist die Vakuole von *hog1*∆-Zellen vermindert GFP-Atg8 auf



Abb. 12: Direkte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT- und *HOG1*-defizienten Hefezellen während osmotischem Stress.

Das GFP-Atg8-Fusionsprotein wurde in WT- (A,C,E) und *hog1*Δ- (B,D,F) Zellen exprimiert. Nachdem die Zellen für 4 h in normo-, hypo- oder hyperosmotischem SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert worden waren, wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Nomarskioptik betrachtet. Die Vakuole ist aufgrund des akkumulierten GFPs als grün leuchtende Struktur erkennbar. Aus [56].

In Abb. 12 sind die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dargestellt. Unter Verwendung des zentromerischen Plasmids pGFP-N/*ATG8*, welches für ein *in-frame*-Fusionsprotein aus GFP und Atg8 kodiert, konnte die Bildung von autophagischen Vesikeln in transformierten WT- und *hog1* Δ -Hefezellen nach Inkubation in N-freiem Medium mit Nomarskioptik und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Nach vierstündiger Inkubation in N-freiem normoosmotischem Medium (150 mosmol/L) und Zugabe des Proteinase-B-Inhibitors PMSF, zeigte sich in der Vakuole von WT- und *hog1* Δ -Zellen eine starke Ansammlung von GFP. In WT-Zellen war dies auch unter hypo- (30 mosmol/L) und hyperosmotischen Stress) zu beobachten. In *hog1* Δ -Zellen hingegen war unter anisoosmotischen Bedingungen kaum GFP in der Vakuole sichtbar.

Die Deletion von *HOG1* führte zu einer Osmosensitivität der Autophagie in Hefezellen, was durch eine signifikant verringerte intravakuoläre GFP-Menge

Ergebnisse

sichtbar wurde. Das Zytoplasma der *HOG1*-defizienten Hefezellen wies hingegen GFP-Atg8 auf. Da bei der Initiation der Segregation durch N-Mangel vermehrt Atg8 exprimiert wird [33], lässt diese Beobachtung grundsätzlich darauf schließen, dass die Bildung der präautophagosomalen Struktur in *hog1*∆-Zellen durch osmotischen Stress nicht behindert wird.

4.1.4 Die Vitalität von hog1∆-Zellen ist nach Induktion der Autophagie durch N-Mangel bei anisoosmotischer Umgebungsosmolarität bis 500 mosmol/L nicht beeinträchtigt

Um zu überprüfen, wie sich eine längere anisoosmotische Inkubation bei der Induktion der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium auf die Vitalität der verwendeten Hefezellen auswirkt, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt (Kapitel 3.2.3.2).



Abb. 13: Nach Inkubation in N-freiem Medium bei anisoosmotischer Umgebungsosmolarität bis 500 mosmol/L ist die Vitalität von WT- und *hog1*∆-Zellen nicht beeinträchtigt.

Die Zellen wurden in Vollmediumkulturen angezogen und anschließend für 4 h in N-freiem Medium bei osmotischem Stress (30-1400 mosmol/L) inkubiert (Kapitel 3.2.3.2). Gezeigt ist das Wachstum des Wildtypstammes (\bullet) im Vergleich zu dem des *HOG1*-Disruptionsstammes (\bigcirc) nach 4 h N-Mangel in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n = 3 separaten Versuchen. Aus [56].

Während die Inkubation der untersuchten Zellen bei anisoosmotischer Umgebungsosmolarität von 30 bis 500 mosmol/L die Vitalität nicht beeinträchtigte, nahm die Überlebensfähigkeit der Zellen ab einer extrazellulären Osmolarität von mehr als 600 mosmol/L rapide ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Autophagieaktivität in den Folgeversuchen bei moderatem osmotischem Stress von 30 bis 500 mosmol/L untersucht.

4.1.5 Während osmotischem Stress ist die Degradation von GFP-Atg8 in *hog1*∆-Zellen verringert

GFP-Atg8-exprimierende WT- und *hog1*∆-Zellen wurden in SD(-N)-Medium mit einer Osmolarität von 150, 30 und 500 mosmol/L für 8 h inkubiert und die Autophagieaktivität über die Bestimmung der GFP-Atg8-Degradation (Kapitel 3.2.4.4) ermittelt (Abb. 14).

Die GFP-Atg8-Degradation betrug in WT-Zellen nach 8 h unter normo-, hypo- und hyperosmotischen Inkubationsbedingungen $100 \pm 0\%$ (n = 3), $92 \pm 8\%$ (n = 3) und $100 \pm 3\%$ (n = 3) und in *hog1* Δ -Zellen 89 ± 4% (n = 3), 53 ± 13% (n = 3) und 51 ± 11% (n = 3) (Abb. 14).

Die Ergebnisse zeigen, dass die durch N-Mangel induzierte Autophagie hier fast linear verlief und innerhalb von Minuten induziert werden konnte. Hierbei war die GFP-Atg8-Degradation in WT-Zellen und *hog1*∆-Zellen unter anisoosmotischen Inkubationsbedingungen schon innerhalb der ersten beiden untersuchten Stunden signifikant unterschiedlich. Die absolute Differenz der Degradation vergrößerte sich in fast linearer Weise über die Zeit weiter.

Die Induktion der Autophagieaktivität bei anisoosmotischer Umgebungsosmolarität wurde in den Folgeexperimenten daher grundsätzlich zum Zeitpunkt 4 h nach Beginn der Inkubation in N-freiem Medium untersucht.



Abb. 14: Die GFP-Atg8-Degradation in WT- und *hog1*∆-Zellen über 8 h in Abhängigkeit von der Umgebungsosmolarität.

WT- (•) und *hog1*_Δ- (\bigcirc) Zellen, die das GFP-Atg8-Fusionsprotein exprimieren, wurden für 8 h in normo- (150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert und wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Gezeigt ist die GFP-Atg8-Degradation im Wildtypstamm im Vergleich zum *HOG1*-Disruptionsstamm über 8 h N-Mangel in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. Die Degradation der WT-Zellen bei normoosmotischer Inkubation wurde zum Zeitpunkt 8 h als 100% festgelegt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n = 3 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.



Abb. 15 A: Die Degradation von GFP-Atg8 führt zur Bildung von freiem GFP.

WT- und $hog1\Delta$ -Zellen, die das GFP-Atg8-Fusionsprotein exprimieren, wurden für 4 h in normo-(150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert und wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Gezeigt ist die GFP-Atg8-Degradation im Wildtypstamm im Vergleich zum *HOG1*-Disruptionsstamm über 4 h N-Mangel in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots aus n ≤ 34 Experimenten. Um die hier aufgetragenen Proteinmengen zu korregieren, wurden die Blots auf die entsprechenden PGK-Mengen hin "normiert". Aus [56].



Abb. 15 B: Osmosensitivität der GFP-Atg8-Degradation in *hog1*^Δ-Zellen.

Gezeigt wird die graphische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung von n \leq 34 Experimenten an WT- (\bullet) und *hog1* Δ -Zellen (\bigcirc). Die GFP-Atg8-Degradation wurde berechnet durch den Vergleich mit den WT-Kontroll-Experimenten (4h, normoosmotische Inkubation in N-freiem Medium) und der Normalisierung der GFP-Werte mit der entsprechenden PGK-Menge. Die Menge an freiem GFP in WT-Zellen bei normoosmotischer Inkubation wurde zum Zeitpunkt 4 h als 100% festgelegt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n \leq 34 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Aus [56].
Ergebnisse

In WT- und hog1_Δ-Zellen führte die Inkubation in N-freiem Medium zu einer starken Induktion der GFP-Atg8-Degradation (Abb. 15 A). Die Menge an freiem GFP korrespondiert mit der Autophagieaktivität, da GFP proteolysestabil ist und in der Vakuole akkumuliert. Bei normoosmotischen Inkubationsbedingungen (150 mosmol/L) konnte kein signifikanter Unterschied in der GFP-Atg8-Degradation zwischen WT- und *hog1*^Δ-Zellen festgestellt werden (Abb. 15 B). Unter moderaten anisoosmotischen N-freien Inkubationsbedingungen zeigten WT-Zellen keine signifikante Veränderung der Autophagieaktivität zur normoosmotischen Kontrolle. Bei hyperosmotischen 200 bis 500 mosmol/L stieg die Autophagieaktivität in WT-Zellen leicht an. Die GFP-Atg8-Degradation betrug in WT-Zellen unter normo-(150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) und hyperosmotischen (500 mosmol/L) Inkubationsbedingungen 100 \pm 0% (n = 34), 96 \pm 4% (n = 10) und 113 \pm 4% (n = 5) und in *hog1* Δ -Zellen 86 ± 5% (n = 27), $56 \pm 9\%$ (n = 7) und $56 \pm 14\%$ (n = 4) nach 4 h anisoosmotischer Inkubation. *Hog1* Δ -Zellen zeigten folglich eine verringerte Fähigkeit der GFP-Atg8-Degradation via Autophagie bei moderatem osmotischem Stress.



4.1.6 In *hog1*∆-Zellen wird die Proteolyserate durch die extrazelluläre Osmolarität moduliert

Abb. 16: Proteolysemessung in WT-, *hog1* Δ - und *aut9* Δ -Zellen während osmotischem Stress.

Die Proteolyserate von WT- (\bullet), *hog1* Δ - (\bigcirc) und *aut9* Δ - (\checkmark) Zellen wurde mittels Freisetzung von [³H]-assozierter TCA-löslicher Radioaktivität bestimmt. Die untersuchten Hefezellen wurden in normo- (150 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) SD(-N)-Medium bei 30°C für 4 h gehungert und wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben die Proteolyserate bestimmt. Als Negativkontrolle wurde der Stamm *aut9* Δ verwendet, der keine Proteolyseaktivität aufweist. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen. Aus [56].

Die Proteolyserate wurde unter normo-, hypo- und hyperosmotischen Inkubationsbedingungen ermittelt. Im Vergleich zu dem Proteolyse-defizienten Stamm *aut9* Δ zeigten WT- und *hog1* Δ -Zellen eine ansteigende Proteolyseaktivität während Inkubation in normoosmotischem N-freiem Medium (150 mosmol/L) über den untersuchten Zeitraum von 4 h (Abb. 16). Bei hyperosmotischer Inkubation wiesen *hog1* Δ -Zellen jedoch eine verringerte Proteolyseaktivität im Vergleich zu WT-Zellen auf.

Während osmotischem Stress fiel die Proteolyserate in $hog1\Delta$ -Zellen von 1,3 ± 0,2 % pro 3 h (n = 8) bei Inkubation in normoosmotischem N-freiem Medium (150 mosmol/L) auf 0,5 ± 0,2 % pro 3 h (n = 5) unter hypoosmotischen Inkubationsbedingungen (30 mosmol/L) und 0,2 ± 0,2 % pro 3 h (n = 3) unter

hyperosmotischen Bedingungen (500 mosmol/L) ab. Die entsprechenden Proteolyseraten der WT-Zellen pro 3 h betrugen $1,3 \pm 0,2 \%$ (n = 8), $1,0 \pm 0,1 \%$ (n = 5) und $0,8 \pm 0,3 \%$ (n = 3) bei normoosmotischen (150 mosmol/L), hypoosmotischen (30 mosmol/L) und hyperosmotischen (500 mosmol/L) Inkubationsbedingungen (Abb. 17).

Ebenso wie die GFP-Atg8-Degradation, zeigte also auch die Proteolyse in *hog1*∆-Zellen eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des osmotischen Stresses und der Proteolyseaktivität. Die Hemmung der Proteolyse war hierbei dem Ausmaß der Anisoosmolarität proportional.



Abb. 17: Osmosensitivität der Proteolyse in *hog1*∆-Zellen.

Von WT- (schwarz), $hog1\Delta$ - (weiß) und $aut9\Delta$ - (grau) Zellen wurde die Proteolyserate (pro 3 h) mittels Freisetzung von [³H]-assozierter TCA-löslicher Radioaktivität bestimmt. Die untersuchten Hefezellen wurden für insgesamt 4 h in normo- (150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) N-freies Medium bei 30°C gehungert und wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben die Proteolyserate bestimmt. Gezeigt ist die Proteolyserate in WT-Zellen im Vergleich zu $hog1\Delta$ -Zellen nach 4 h Inkubation in N-freiem Medium in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. Als Negativkontrolle wurde der Stamm $aut9\Delta$ verwendet, der keine Proteolyseaktivität aufweist. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n ≤ 8 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Aus [56].

Ergebnisse

4.2 Der PBS2-Disruptionsstamm

Ziel dieser Untersuchungen war es zu klären, ob nicht nur Hog1 eine regulatorische Funktion für die Autophagie während osmotischem Stress ausübt, sondern ob auch das *upstream* (*HOG1*-Signalweg) von Hog1 gelegene Protein Pbs2 dabei eine Rolle spielt (Kapitel 1.4.1).







Das GFP-Atg8-Fusionsprotein wurde in WT- (A,C,E) und *pbs2*∆- (B,D,F) Zellen exprimiert. Nachdem die Zellen für 4 h in normo-, hypo- oder hyperosmotischem SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert worden waren, wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Nomarskioptik betrachtet.

Nach vierstündiger Inkubation in normoosmotischem N-freiem Medium und Zugabe des Proteinase-B-Inhibitors PMSF zeigte sich in der Vakuole von GFP-Atg8-exprimierenden WT- und *pbs2* Δ -Zellen eine starke Ansammlung von GFP. Unter hypo- und hyperosmotischen N-freien Inkubationsbedingungen (osmotischer Stress) war in *pbs2* Δ -Zellen kaum GFP in der Vakuole erkennbar (Abb. 18).

Ebenso wie die Deletion von *HOG1* (Abb. 12) führte auch eine Deletion von *PBS2* zu einer Osmosensitivität der Autophagie in Hefezellen, was durch eine signifikant verringerte intravakuoläre GFP-Menge sichtbar wurde. Das Zytoplasma der

pbs2△-Zellen wies ebenfalls GFP-Atg8 auf. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass auch in *pbs2*△-Zellen die Bildung der Autophagosomen durch osmotischen Stress nicht beeinflusst wurde.

4.2.2 Osmosensitivität der Autophagie in pbs2^Δ-Zellen

GFP-Atg8-exprimierende WT- und *pbs2*∆-Zellen wurden in SD(-N)-Medium mit einer Osmolarität von 150, 30 und 500 mosmol/L für 4 h inkubiert und die Autophagieaktivität über die GFP-Atg8-Degradation (Kapitel 3.2.4.4) bestimmt.



Abb. 19: Osmosensitivität der GFP-Atg8-Degradation in pbs2∆-Zellen.

WT- und *pbs2* Δ -Zellen, die das GFP-Atg8-Fusionsprotein exprimieren, wurden für 4 h in normo-(150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert und wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradationsrate bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots aus n \leq 3 Experimenten. Um die hier aufgetragenen Proteinmengen zu korregieren, wurden die Blots auf die entsprechenden PGK-Mengen hin "normiert".

Ergebnisse

In WT- und *pbs2* Δ -Zellen führte der N-Mangel zu einer starken Induktion der GFP-Atg8-Degradation (Abb. 19). Bei normoosmotischer Inkubation (150 mosmol/L) konnte kein signifikanter Unterschied in der GFP-Atg8-Degradation zwischen WTund *pbs2* Δ -Zellen festgestellt werden. Unter anisoosmotischen N-freien Inkubationsbedingungen zeigten *pbs2* Δ -Zellen eine Verringerung der Autophagieaktivität im Vergleich zur normoosmotischen Kontrolle. *Pbs2* Δ -Zellen zeigen folglich ebenfalls eine Osmosensitivität der Autophagie während osmotischem Stress. Weitere Untersuchungen an *pbs2* Δ -Zellen werden zur Zeit im Rahmen des SFB 575 vorgenommen.

4.3 Die Disruption von SHO1 und SLN1 in wildtypischen Hefezellen

Parallel zu den bisher beschriebenen Proteinen Hog1 (Kapitel 4.1) und Pbs2 (Kapitel 4.2) sollten die *upstream* (*HOG1*-Signalweg) von diesen beiden Proteinen gelegenen Proteine Sho1 und Sln1 auf ihre Funktion für die Autophagie während osmotischem Stress untersucht werden. Säugerhomologe dieser Proteine sind bisher nicht bekannt. Es wurden wie in Kapitel 3.2.2.6 beschrieben eine *SHO1*- und *SLN1*-Deletion an wildtypischen Hefezellen des Stammes WCG4a vorgenommen. Die Deletion von *SLN1* war in der Hefe letal [108]. Es konnten daher keine vitalen *sln1* Δ -Zellen erzeugt werden. Die Deletion von *SHO1* konnte hingegen erfolgreich vorgenommen werden.

4.3.1 Die Deletion von SHO1 führt nicht zur Osmosensitivität der Hefe

Um die Auswirkung einer SHO1-Deletion in S. cerevisiae in vivo zu untersuchen, wurde ein Osmosensitivitätsassay (Kapitel 3.2.3.4) an WT- und sho1 Δ -Zellen vorgenommen. Die Deletion von SHO1 führte nicht zu einer Osmosensitivität der Hefezellen. Im untersuchten Osmolaritätsbereich (250 bis 1400 mosmol/L) konnte kein Unterschied in der Vitalität im Vergleich zu WT-Zellen festgestellt werden. Der osmotische Bereich von 250 bis 1400 mosmol/L schien sowohl für WT-Zellen als auch sho1 Δ -Zellen nicht-letaler osmotischer Stress zu sein. Weitere

Untersuchungen an *sho1*∆-Zellen werden momentan im Rahmen des SFB 575 vorgenommen.

4.4 Untersuchungen zu Mechanismen der Osmosensitivität der Autophagie in *hog1*∆-Zellen

4.4.1 Reversibilität der Autophagie in *hog1*∆-Zellen

Um zu zeigen, dass die verringerte Autophagie während osmotischem Stress in *hog1*∆-Zellen von der Umgebungsosmolarität abhängig ist und nicht einfach vom Nährstoffangebot beeinflusst wird, wurde hypoosmotisches (30 mosmol/L) N-freies Medium entweder mit 60 mM NaCl oder 120 mM Raffinose auf Normoosmolarität (150 mosmol/L) komplementiert.

Das Komplementieren des hypoosmotischen N-freies Mediums mit NaCl oder Raffinose führte zu einer Wiederherstellung der Autophagie auf das Ausgangsniveau (150 mosmol/L) in *hog1* Δ -Zellen (Abb. 20 A). Andererseits führte auch hyperosmotisches N-freies Medium, nach Zugabe von entweder Raffinose, Sorbitol oder (NH₄)₂SO₄ zu einem normoosmotischen SD(-N)-Medium, zu einer verringerten Autophagie in *hog1* Δ -Zellen (Abb. 20 B).

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die verringerte Fähigkeit von *hog1*∆-Zellen zur Autophagie bei hypo- oder hyperosmotischem Stress von der extrazellulären Osmolarität und nicht vom Nährstoffangebot oder der Art der verwendeten osmotisch aktiven Substanzen abhängt. Dieser Prozess ist reversibel.

Ergebnisse



Abb. 20: Unabhängigkeit der Autophagie von der Verfügbarkeit von Nährstoffen.

In WT- (schwarz) und *hog1*Δ- (weiß) Zellen wurde wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Gezeigt ist die GFP-Atg8-Degradation im Wildtypstamm im Vergleich zum *HOG1*-Disruptionsstamm nach 4 h Inkubation in N-freiem Medium in Abhängigkeit vom verwendeten Inkubationsmedium. Zur Induktion der Autophagie wurde als Kontrolle hypo- (30 mosmol/L) und normoosmotisches (150 mosmol/L) SD(-N)-Medium verwendet. Zum einen wurde hypoosmotisches N-freies Medium mit der entsprechenden Menge an NaCI oder Raffinose auf 150 mosmol/L komplementiert (**A**). Zum anderen wurde hyperosmotisches N-freies Medium entweder durch Zugabe von NaCI, Raffinose, Sorbitol oder (NH₄)₂SO₄ zum normoosmotischen SD(-N)-Medium hergestellt (**B**). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n = 3 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Aus [56].

4.4.2 Untersuchungen zur Lokalisation von Atg8 und der präautophagosomalen Struktur

Bei der direkten Fluoreszenzmikroskopie wiesen GFP-Atg8-exprimierende $hog1\Delta$ -Zellen während osmotischem Stress vermehrt GFP-Atg8-assoziierte, punktförmige Strukturen auf (Abb. 21, siehe auch Abb. 12). Um diese Strukturen näher zu charakterisieren wurden GFP-Atg9-exprimierende WT- und $hog1\Delta$ -Zellen hergestellt (Kapitel 3.1.2 und 3.2.2.3).

Atg9 ist ein Transmembranprotein, welches unter anderem an der präautophagosomalen Struktur (PAS) lokalisiert ist [109].

Mit Hilfe von Lokalisationsexperimenten (Kapitel 3.2.4.8) wurde untersucht, ob es sich bei den auftretenden punktförmigen Strukturen um PAS-assoziierte Fluoreszenz handelt. Dieser Vergleich sollte zeigen, ob diese Strukturen in Verbindung mit der verringerten Autophagieaktivität bei N-Mangel und osmotischem Stress in $hog1\Delta$ -Zellen stehen.



pGFP-Atg8

wr
hog1Δ

Image: Stress of the stress of th

Abb. 21: Direkte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT- und *HOG1*-defizienten Hefezellen während osmotischem Stress.

Die Fusionsproteine GFP-Atg8 und GFP-Atg9 wurden in WT- und *hog1*∆-Zellen exprimiert. Nachdem die Zellen für 4 h in normo-, hypo- oder hyperosmotischem SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert worden waren, wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Nomarskioptik betrachtet (Kapitel 3.2.4.8).

Nach Inkubation in normoosmotischem N-freiem Medium zeigten sich in GFP-Atg8-exprimierenden WT- und $hog1\Delta$ -Zellen wenige (höchstens zwei) GFP-Atg8assoziierte, punktförmige Strukturen im Zytoplasma. Unter anisoosmotischen Hungerbedingungen (osmotischer Stress) waren in $hog1\Delta$ -Zellen mehrere dieser Strukturen (bis zu fünf) im Zytoplasma zu beobachten.

Die Betrachtung GFP-Atg9-exprimierender WT- und *hog1*∆-Zellen zeigte, dass nach Inkubation in normoosmotischem N-freiem Medium eine GFP-Atg9-assoziierte, punktförmige Struktur im Zytoplasma erkennbar war. Dieser Befund änderte sich auch während osmotischem Stress nicht.

Während osmotischem Stress bildeten sich in *hog1*∆-Zellen signifikant mehr GFP-Atg8-assoziierte Strukturen aus als unter Inkubation in normoosmotischem Nfreiem Medium. WT-Zellen zeigten keinen deutlichen Unterschied. Die Atg8-assoziierten, fluoreszierenden Strukturen im Zytoplasma von *hog1*∆-Zellen während osmotischem Stress und Inkubation in N-freiem Medium lokalisierten nicht mit den GFP-Atg9-assoziierten Signalen. Folglich handelt es sich dabei nicht hauptsächlich um PAS.

Eine vermehrte Bildung von PAS kann in $hog1\Delta$ -Zellen unter osmotischem Stress damit weitgehend ausgeschlossen werden und bestätigt damit das Ergebnis, das die Bildung der Autophagosomen in $hog1\Delta$ -Zellen durch osmotischen Stress nicht gehemmt wird (vgl. Kapitel 4.1), sondern dass ein post-Segregationsschritt beteiligt ist.

Außerdem zeigt dieses Lokalisationsexperiment deutlich, dass die verringerte Autophagieaktivität unter anisoosmotischen Bedingungen in *hog1*∆-Zellen nicht durch eine fehlende oder abnormale Induktion der Autophagie zu erklären ist (vgl. Kapitel 4.1.5), da kein signifikanter makroskopischer Unterschied in der Bildung von PAS bzw. der Segregation im Vergleich zu WT-Zellen zu erkennen war.

Aussagen über die Funktion des PAS in WT- und *hog1*∆-Zellen sind allerdings mit den hier verwendeten Techniken nicht möglich.

4.4.3 In hog1∆-Zellen wird weder die Lipidierung von Atg8 noch der Phosphorylierungsstatus von Atg13 durch osmotischen Stress beeinflusst

Um die molekulare Funktion von Hog1 für die Regulation der Autophagie zu identifizieren, wurden der Lipidierungsstatus von Atg8 (Abb. 22) und der Phosphorylierungsstatus von Atg13 (Abb. 23) untersucht.

Atg8 ist ein lösliches Ubiquitin-ähnliches Protein, welches einer Lipid-Konjugation mit Phosphatidylethanolamin (PE) unterworfen ist. Daraus resultiert eine Membran-assoziierte Atg8-PE Variante des Proteins, welche die Segregation reguliert. Hefezellen wurden für 4 h entweder in normoosmotischem (150 mosmol/L), hypoosmotischem (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) SD(-N)-Medium gehungert und stündlich Proben für eine Immunoblot-Analyse entnommen (Kapitel 3.2.4.5).

Unter normo-, hypo- und hyperosmotischen N-freien Inkubationsbedingungen wurde in WT- und *hog1* Δ -Zellen das Protein Atg8 und die lipidierte Form Atg8-PE exprimiert und konnte im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 22). Ein signifikanter Unterschied in der Expression beider Proteine wurde im direkten Vergleich nicht beobachtet. Weder der Vergleich von WT-Zellen mit *hog1* Δ -Zellen noch der Vergleich der anisoosmotischen Bedingungen mit normoosmotischem N-Mangel wies eine Veränderung der Expression auf. In *atg8* Δ -Zellen konnte kein Atg8 nachgewiesen werden.

Folglich beeinflusst das Fehlen von Hog1 nicht die Atg8-PE-Konjugation. Hog1 ist also nicht essentiell für die Segregation, noch verändert osmotischer Stress die Intensität der Expression von Atg8.

Die Untersuchung des Lipidierungsstatus von Atg8 bei N-Mangel und osmotischem Stress konnte keinen Aufschluss über die verringerte Autophagieaktivität in *hoq1*∆-Zellen liefern. Daraufhin wurde der Phosphorylierungsstatus von Atg13 untersucht.



Abb. 22: Die Lipidierung von Atg8 wird nicht durch osmotischen Stress beeinflusst.

Um den Lipidierungsstatus von Atg8 (14 kDa) zu untersuchen, wurden WT- (\bullet) und *hog1* Δ -(\bigcirc) Zellen in normo- (150 mosmol/L; (**A**)), hypo- (30 mosmol/L; (**B**)) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L; (**C**)) SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert und wie in Kapitel 3.2.4.5 beschrieben der Atg8-Lipidierungsstatus bestimmt. Als Negativkontrolle wurde ein *ATG8*-defizienter Stamm (\mathbf{v}) (*atg8* Δ) verwendet. Dargestellt ist die Atg8-Lipidierung in WT-Zellen im Vergleich zu *hog1* Δ -Zellen über 4 h Inkubation in N-freiem Medium in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. Auf der linken Seite sind repräsentative Western-Blots aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt und auf der rechten Seite die entsprechende graphische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung dieser gezeigten Blots. Aus [56].



Abb. 23: Die Dephosphorylierung von Atg13 wird nicht durch osmotischen Stress beeinflusst.

Atg13-überexprimierende WT- und $hog1\Delta$ -Zellen und $atg13\Delta$ -Zellen wurden für 4 h in normo-, hypo- oder hyperosmotischem SD(-N)-Medium bei 30°C gehungert (**A**). Zusätzlich wurde die Autophagie auch durch Zugabe von 0,2 µg/ml Rapamycin zum Inkubationsmedium induziert (**B**). Es wurden stündlich Proben entnommen und wie in Kapitel 3.2.4.6 beschrieben der Atg13-Phosphorylierungsstatus bestimmt. Es wurden repräsentative Western-Blots aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Aus [56]. Nach dem momentanen Stand der Forschung ist die Dephosphorylierung von Atg13 während Inkubation in N-freiem Medium oder durch Zugabe von Rapamycin unverzichtbar für die Induktion der Segregation. Der Phosphorylierungsstatus von Atg13 war in WT- und *hog1* Δ -Zellen während osmotischem Stress unverändert (Abb. 23).

Die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchungen zur Lipidierung von Atg8 und der Dephosphorylierung von Atg13 während osmotischem Stress zeigen, dass in *hog1*∆-Zellen weder Unterschiede in der Atg8-Lipidierung noch der Atg13-Phosphorylierungsstatus die verringerte Autophagieaktivität bei N-Mangel und osmotischem Stress im Vergleich zu WT-Zellen erklären können.

Kandidaten für die Regulation der Osmosensitivität der Autophagie wären demnach Proteine, die *downstream* der Bildung der präautophagosomalen Struktur bzw. der Segregation eine Rolle spielen. Möglicherweise wird ein post-Segregationsschritt osmosensitiv reguliert.

4.4.4 Die GFP-Atg8-Degradation in WT-Zellen wird durch Zugabe von p38^{MAPK}-Inhibitoren nicht beeinflusst

Der Einfluss von p38^{MAPK}-Inhibitoren auf den Proteinabbau ist aus Proteolyseversuchen an Säugerzellen bekannt [6]. Das Hefeanalog zur Säuger p38^{MAPK} ist das Protein Hog1. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die in Säugerzellen auf den Proteinabbau hemmend wirkenden p38^{MAPK}-Inhibitoren auch in Hefezellen eine Wirkung zeigen und ob sich der durch Ausschaltung von Hog1 erzielte genetische Defekt pharmakologisch imitieren ließ.

Zu WT-Zellen wurde während Inkubation in N-freiem Medium und anisoosmotischer Inkubation entweder SB 203580, SB 202190 oder PD 169316 hinzugegeben (Tab. 11) und die GFP-Atg8-Degradation über 4 h untersucht (Kapitel 3.2.4.4).

Die Substanzen SB 203580 [110] und SB 202190 [111] sind membrangängige potente Inhibitoren der p38^{MAPK} mit einer hohen Substratspezifität und einer niedrigen K_m (SB 203580: 21 nM, SB 202190: 38 nM). Sie sind strukturell Pyrimidyl-Imidazol-Inhibitoren, die die ATP-Bindungsstelle der p38^{MAPK} blockieren. PD 163916 ist ebenfalls ein Pyrimidyl-Imidazol-Inhibitor und ebenfalls ein selektiver Inhibitor der p38^{MAPK} (K_m 89 nM) [112].



Abb. 24: Die GFP-Atg8-Degradation in WT-Zellen wird durch Zugabe von p38^{MAPK}-Inhibitoren nicht beeinflusst.

WT-Zellen, die das GFP-Atg8-Fusionsprotein exprimieren, wurden entweder in SD(-N)-Medium oder SD(-N)-Medium mit Zusatz von verschiedenen p38^{MAPK}-Inhibitoren bei 30°C inkubiert und wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Die Degradation des WT bei Inkubation in SD(-N)-Medium zum Zeitpunkt 4 h wurde als 100% festgelegt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von n \leq 3 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Die vorliegenden Ergebnisse der Inhibitorstudien zeigen, dass keiner der verwendeten p38^{MAPK}-Inhibitoren eine signifikant hemmende Wirkung auf die GFP-Atg8-Degradation in WT-Zellen in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität zeigte.

Es ist möglich, dass die verwendeten Inhibitoren nicht permeabel für die Zellwand der Hefe waren. Sollten die Inhibitoren doch die Zellwand der Hefe durchdrungen haben und ins Zellinnere gelangt sein, so könnte auch die genetische Divergenz zwischen Hefezellen und Säugerzellen eine Rolle gespielt haben. Es wäre denkbar, dass p38^{MAPK}-Inhibitoren nicht an das Hefeprotein Hog1 binden können.

4.5 Die Rapamycin-induzierte Autophagie weist keine Osmosensitivität auf

In WT- und *hog1*∆-Zellen führte die Zugabe von Rapamycin zum Inkubationsmedium zu einer zeitabhängigen Induktion der GFP-Atg8-Degradation (Abb. 25 A).

Nach 4 h normoosmotischer Inkubation (150 mosmol/L) aber auch moderatem osmotischem Stress (30 und 500 mosmol/L), zeigten *hog1*∆-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen eine unveränderte Fähigkeit zur GFP-Atg8-Degradation via Autophagie (Abb. 25 C).



Abb. 25 A: Die Rapamycin-induzierte GFP-Atg8-Degradation in *hog1*∆-Zellen reagiert nicht auf osmotischen Stress.

WT- und *hog1* Δ -Zellen, die das GFP-Atg8-Fusionsprotein exprimieren, wurden für 4 h in normo-(150 mosmol/L), hypo- (30 mosmol/L) oder hyperosmotischem (500 mosmol/L) YPD-Medium mit Zusatz von 0,2 µg/ml Rapamycin bei 30°C inkubiert und wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Die Degradation des Fusionsproteins GFP-Atg8 führt zur vermehrten Bildung von freiem GFP über die Zeit. Es wurden repräsentative Western-Blots aus n ≤ 8 Experimenten dargestellt. Aus [56].







Dargestellt ist in (**B**) die densitometrische Quantifizierung von n \leq 8 Experimenten an WT- (\bullet) und $hog1\Delta$ - (\bigcirc) Zellen über 4 h bei normoosmotischer Inkubation und Zugabe von Rapamycin. Die GFP-Atg8-Degradation des WT bei normoosmotischer Inkubation zum Zeitpunkt 4 h wurde als 100% festgelegt (**C**). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n \leq 8 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Aus [56].

Ergebnisse

Die in Abb. 25 A bis C gezeigten Ergebnisse der Rapamycin-induzierten Autophagie unterscheiden sich klar von den Ergebnissen der durch N-Mangel induzierten Autophagie (in Abb. 25 C zum direkten Vergleich klein dargestellt; siehe auch Abb. 15 B). Die durch Inkubation in N-freiem Medium induzierte Autophagie war in $hog1\Delta$ -Zellen während osmotischem Stress osmosensitiv, die durch Rapamycin induzierte Autophagie hingegen nicht [113].

Dies lässt die Vermutung zu, dass bei den beiden verwendeten Methoden der Autophagieinduktion biochemisch unterschiedliche Signalmechanismen beteiligt sind.

4.5.1 In *hog1*∆-Zellen wird die Rapamycin-vermittelte Proteolyse nicht durch die extrazelluläre Osmolarität moduliert

Zur näheren Charakterisierung der Rapamycin-vermittelten Autophagie in *hog1* Δ -Zellen wurde die Proteolyserate von WT-Zellen, *hog1* Δ -Zellen und *aut9* Δ -Zellen (Autophagie-defizient) unter normoosmotischen (150 mosmol/L) und hyperosmotischen (500 mosmol/L) Inkubationsbedingungen unter Zugabe von 0,2 µg/ml Rapamycin über einen Zeitraum von 4 h untersucht (Abb. 26). Die Induktion der Autophagie führte zu einer stabilen Freisetzung von [³H]-assozierter TCA-löslicher Radioaktivität in den untersuchten Zellen.





Abb. 26: Fehlende Osmosensitivität der Rapamycin-induzierten Proteolyse in *hog1*∆-Zellen. WT- (●, schwarz), *hog1*∆- (○,weiß) und *aut9*∆- (▼) Zellen wurden für 4 h in normo- (**A**), hypooder hyperosmotischem (**B**) YPD Medium unter Zugabe von 0,2 µg/ml Rapamycin bei 30°C inkubiert und wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben die Proteolyserate bestimmt. Gezeigt ist die Proteolyserate im Wildtypstamm im Vergleich zum *HOG1*-Disruptionsstamm in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität (**C**). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n = 3 separaten Versuchen. *, ***, ****; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Aus [56, 113].

Ergebnisse

Während bei der Induktion der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium die Proteolyserate über 3 h in *hog1* Δ -Zellen bei hyperosmotischem Stress um 1,1 % abnahm (Abb. 17), führte die Rapamycin-induzierte Autophagie sowohl bei WT-als auch bei *hog1* Δ -Zellen zu einer stabilen Proteolyserate über den untersuchten Zeitraum von 4 h (Abb. 26 C). Im Vergleich zum Autophagie-defizienten Stamm (*aut9* Δ), der als Negativkontrolle verwendet wurde und keine proteolytische Aktivität aufweist, zeigten sowohl WT- als auch *HOG1*-defizienten Zellen eine stabile Proteolyserate. Sowohl bei normoosmotischen Inkubationsbedingungen (150 mosmol/L,(A)) als auch bei hyperosmotischer Inkubation (500 mosmol/L,(B)) war die Proteolyserate in *hog1* Δ -Zellen im Vergleich zu WT-Zellen unverändert. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Proteolysemessung in *hog1* Δ -Zellen zeigen, dass die Rapamycin-induzierte Autophagie im Gegensatz zur Autophagie, die durch N-Mangel induziert wird, nicht osmosensitiv ist [113].

4.5.2 Ein quantitativer Vergleich der GFP-Atg8-Degradation bei Induktion der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium im Vergleich zur Induktion durch Zugabe von Rapamycin

Um eine quantitative Aussage über die GFP-Atg8-Degradation in *hog1*∆-Zellen während osmotischem Stress bei Induktion der Autophagie durch Inkubation in N-freiem Medium und Induktion der Autophagie durch Zugabe von Rapamycin machen zu können, wurde die Intensität der Autophagieinduktion beider Methoden miteinander verglichen.

Dazu wurde die GFP-Atg8-Degradation zum einen durch Inkubation in N-freiem Medium [SD(-N)-Medium] und zum anderen durch Zugabe von Rapamycin zum Inkubationsmedium in WT- und *hog1*∆-Zellen induziert und über einen Zeitraum von 4 h untersucht. Als Negativkontrolle wurde auch die GFP-Atg8-Degradation ohne Induktion der Autophagie gemessen (CMura⁻ -Medium).





WT- und *hog1*Δ-Zellen, die das GFP-Atg8-Fusionsprotein exprimieren, wurden entweder in CMura⁻-Medium mit Zusatz von 0,2 µg/ml Rapamycin (\blacklozenge), SD(-N)-Medium (\diamondsuit) oder CMura⁻-Medium (\blacktriangledown) bei 30°C inkubiert und wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben die GFP-Atg8-Degradation bestimmt (n = 3). Die Degradation der WT-Zellen bei Inkubation in CMura⁻-Medium zum Zeitpunkt 4 h wurde als 100% festgelegt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM von n = 3 separaten Versuchen. *, **, ***; signifikant unterschiedlich zur jeweiligen WT-Kontrolle; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

GFP-Atg8-exprimierende WT- und $hog1\Delta$ -Zellen wurden für 4 h entweder in Selektionsmedium (CMura⁻-Medium, \checkmark), Selektionsmedium mit Zugabe von Rapamycin (\blacklozenge) oder N-freiem Medium (SD(-N), \diamondsuit) inkubiert und anschließend die Autophagieaktivität mittels Immunoblot ermittelt. In WT- und $hog1\Delta$ -Zellen induzierte sowohl die Zugabe von Rapamycin als auch die Inkubation in N-freiem Medium die GFP-Atg8-Degradation bzw. die Autophagie. Die Inkubation in Selektionsmedium führte, wie erwartet, nicht zur Induktion der Autophagie. Die Zugabe von Rapamycin zum Inkubationsmedium führte zu einer ähnlich starken Induktion der Autophagie wie die Induktion durch N-Mangel [113].

4.6 Ein Vergleich von Autophagiemechanismen in Hefe und Leber

Wie aus früheren Arbeiten bekannt ist, erhöht extrazelluläre Hypotonizität (-80 mosmol/L) dauerhaft den Hydratationszustand von Leberzellen. Eine Zunahme des Zellvolumens führt zu einer reversiblen Hemmung der Proteolyse, die nach Wiederherstellung der normalen Osmolarität auf das Ausgangsniveau zurück geht. Die Zunahme der Lebermasse, das Ausmaß der Zellschwellung und die damit einhergehende Hemmung der Proteolyserate sind eng mit dem Ausmaß der Hypotonizität korreliert [77, 114-116].

Der antiproteolytische Einfluss von Phenylalanin und NH₄Cl (klassischen Hemmstoffen der Proteolyse in Säugerzellen) auf den Proteinabbau ist bisher überwiegend in Proteolysemessungen in der perfundierten Rattenleber untersucht worden. In dieser Arbeit wurde daraufhin untersucht, wie diese Substanzen auf den Proteinabbau in Hefezellen wirken.

4.6.1 Die Hunger-induzierte Autophagie wird in der Hefe - ebenso wie in der Leber - durch Phenylalanin und NH₄Cl gehemmt

Inkubation in	Autophagieaktivität [%]			
N-freiem Medium	WT	hog1 Δ	pbs2∆	
Kontrolle	100 ± 0	97 ± 13	89 ± 2	
+ 2 mM Phenylalanin	42 ± 22 *	44 ± 18 *	53 ± 11 *	
+ 5 mM NH ₄ Cl	15 ± 3 *	18 ± 10 *	50 ± 10 *	

Tab. 13: Die Hunger-induzierte GFP-Atg8-Degradation wird in der Hefe sowohl durch Phenylalanin als auch NH_4CI gehemmt.

In WT-, *hog1* Δ - und *pbs2* Δ -Zellen wurde, wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben, die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Die Hefezellen wurden für 4 h entweder in SD(-N)-Medium (Kontrolle) oder unter Zugabe von 2 mM Phenylalanin oder 5 mM NH₄Cl bei 30°C inkubiert. Die Menge an freiem GFP in WT-Zellen zum Zeitpunkt 4 h wurde als 100% festgelegt. Die Anzahl der Experimente lag bei n = 3 bis 5 pro Bedingung. Symbole: *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, p < 0,05. Phenylalanin [74] und NH₄Cl [117], Hemmstoffe der Proteolyse in Leberzellen, wirkten während Inkubation in N-freiem Medium in allen untersuchten Hefezellen, unabhängig vom Genotyp, ebenfalls stark antiproteolytisch.

4.6.2 In Hefe wirken Phenylalanin und NH₄CI hemmend auf die Hungerinduzierte Proteolyse

Inkubation in	[%]			
N-freiem Medium	WT	hog1∆	pbs2∆	aut9∆
Kontrolle	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0 ± 0 *
+ 2 mM Phenylalanin	0 ± 0,1 *	0,1 ± 0,1*	0 ± 0,1*	0 ± 0 *
+ 5 mM NH₄CI	0 ± 0 *	0 ± 0 *	0 ± 0 *	0 ± 0 *

Tab. 14: In der Hefe wird die Hunger-induzierte Proteolyse durch Phenylalanin und NH₄CI gehemmt.

In WT-, *hog1* Δ - und *pbs2* Δ - und *aut9* Δ - (Negativkontrolle) Zellen wurde, wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben, die Proteolyserate bestimmt. Die Hefezellen wurden für 4 h entweder in SD(-N)-Medium (Kontrolle) oder unter Zugabe von 2 mM Phenylalanin oder 5 mM NH₄Cl bei 30°C inkubiert. Die Anzahl der Experimente lag bei n = 3 bis 5 pro Bedingung. Symbole: *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, p < 0,05.

Die Zugabe von Phenylalanin oder NH₄CI während N-Mangel führte in allen untersuchten Hefezellen, unabhängig vom Genotyp, zu einer fast vollständigen Hemmung der Proteolyse. Dieses Ergebnis der Proteolyseaktivitätsmessung bestätigt das Ergebnis der Bestimmung der Autophagieaktivität mittels GFP-Atg8-Degradation (Tab. 13) in Bezug auf die antiproteolytische Wirkung von Phenylalanin und NH₄Cl in Hefezellen.

4.6.3 In Hefe sind Phenylalanin und NH₄CI ohne Wirkung auf die Rapamycin-induzierte GFP-Atg8-Degradation

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied in der Autophagieaktivität in Bezug auf die Osmosensitivität bei Induktion der Autophagie durch N-Mangel im Vergleich zur Induktion durch Rapamycin erarbeitet werden. In den folgenden Versuchen sollte daraufhin untersucht werden, ob der Unterschied dieser beiden Induktionsarten der Autophagie sich auch bei der Wirkung von Phenylalanin und NH₄CI auf die Autophagieaktivität zeigen lässt.

	Auto		
Rapamycin	WT	hog1 Δ	pbs2 Δ
Kontrolle	100 ± 0	102 ± 9	107 ± 10
+ 2 mM Phenylalanin	188 ± 43 *	278 ± 111 *	322 ± 160 *
+ 5 mM NH₄Cl	209 ± 69 *	301 ± 133 *	274 ± 119 *

Tab. 15: In der Hefe zeigen Phenylalanin und NH₄CI keine hemmende Wirkung auf die Rapamycin-induzierte GFP-Atg8-Degradation.

In WT-, *hog1* Δ - und *pbs2* Δ -Zellen wurde, wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben, die GFP-Atg8-Degradation bestimmt. Die Hefezellen wurden für 4 h entweder in CMura⁻-Medium mit 0,2 µg/ml Rapamycin (Kontrolle) oder unter Zugabe von 2 mM Phenylalanin oder 5 mM NH₄Cl bei 30°C inkubiert. Die Menge an freiem GFP in WT-Zellen zum Zeitpunkt 4 h wurde als 100% festgelegt. Die Anzahl der Experimente lag bei n = 4 pro Bedingung. Symbole: *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, p < 0,05.

Phenylalanin und NH₄Cl hatten eine stimulierende Wirkung auf die Rapamycininduzierte Autophagie in den untersuchten Hefezellen im Vergleich zur Kontrolle. Hier besteht ein klarer Unterschied zwischen Rapamycin-induzierter und Hungerinduzierter Autophagie.

Rapamycin		Proteolyserate [%]			
	WT	hog1 Δ	pbs2 Δ	aut9∆	
Kontrolle	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0 ± 0	
+ 2 mM Phenylalanin	1,0 ± 0,1	$0,7 \pm 0,2$	0,8 ± 0,1	0 ± 0	
+ 5 mM NH₄Cl	$1,4 \pm 0,2$	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0 ± 0	

4.6.4 Phenylalanin und NH₄Cl zeigen keinen Einfluss auf die Rapamycininduzierte Proteolyse

Tab. 16: Phenylalanin und NH_4CI zeigen keinen Einfluss auf die Rapamycin-induzierte Proteolyse.

In WT-, *hog1*_Δ- und *pbs2*_Δ- und *aut9*_Δ- (Negativkontrolle) Zellen wurde, wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben, die Proteolyserate bestimmt. Die Hefezellen wurden für 4 h entweder in SD(-N)-Medium (Kontrolle) oder unter Zugabe von 2 mM Phenylalanin oder 5 mM NH₄Cl bei 30°C inkubiert. Die Anzahl der Experimente lag bei n = 3 bis 5 pro Bedingung. Symbole: *, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, p < 0,05.

Rapamycin führt zur Stimulation der Proteolyse in Hefe (Abb. 26).

Phenylalanin und NH₄Cl hatten keinen antiproteolytischen Effekt auf die Rapamycin-induzierte Proteolyse in den untersuchten Hefezellen im Vergleich zur Kontrolle.

Weder die gemessenen Autophagieaktivitäten (Tab. 15) noch die Proteolyseraten (Tab. 16) konnten eine signifikant hemmende Wirkung von Phenylalanin und NH₄Cl bei Induktion durch Rapamycin in Hefezellen nachweisen.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Rapamycin-induzierte Autophagie phänotypisch mit der Hunger-induzierten Form der Autophaghie weder in Hefe noch in der Leber vergleichbar ist [56, 113].

Diskussion

V Diskussion

5.1 In der Hefe Saccharomyces cerevisiae führt die Deletion von HOG1 zur Osmosensitivität der Autophagie bei osmotischem Stress

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, ob Hog1 in der Hefe - in Analogie zur Säugerleber - eine Rolle bei der durch N-Mangel-induzierten autophagischen Proteolyse spielt. Hierbei war auch von Interesse, ob die oberhalb von Hog1 gelegene Signalkaskade der Osmoregulation, speziell die Proteine Pbs2, Sho1 und Sln1 involviert sind, welche Mechanismen hieran beteiligt sind und ob die Rapamycin-induzierte Proteolyse phänotypisch ähnliche Charakteristika aufweist.

Das S. cerevisiae-Protein Hog1 ist das Ortholog zur Säuger p38^{MAPK}. Da die autophagische Proteolyse in der Säugerleber über den zellulären Hydratationszustand p38^{MAPK}-abhängig reguliert wird [71, 79, 122, 124, 125], lag die Vermutung nahe, dass Hog1 für die Autophagie der Hefe ebenfalls eine regulative Funktion ausübt. Osmosensing und -signalling über die p38^{MAPK} ist in Säugerzellen notwendig für die Regulation der Proteolyse [78]. Hypoosmotische Exposition und Aminosäuren induzieren in der Säugerleber eine anhaltende Zunahme des Hydratationszustandes (siehe auch Einleitung, Abb. 6 oder Diskussion Abb. 30, Kasten) [77, 79, 114, 118, 119]. Diese Modulation des Hydratationszustandes bewirkt per se eine Hemmung des Proteinabbaus, eine Stimulation der Proteinsynthese, eine Steigerung der Taurocholatexkretion sowie verschiedene hepatoprotektive Effekte [6, 77, 81, 126, 127]. Das Osmosensing dieser anhaltenden Hydratationsänderungen erfolgt über Integrinrezeptoren, die Osmoregulation selbst vorwiegend über die p38^{MAPK} [78, 128-130]. Gibt es also hierzu Parallelen in der Hefe?

In der Hefe wurde Hog1 bisher nur als Protein mit MAP-Kinase-Aktivität charakterisiert [67, 131]. Es spielt dort, ebenso wie das Protein Pbs2, eine Rolle im hyperosmotischen Signalweg (*HOG1*-Weg) [67]. Ein Pbs2-Analogon ist in Säugerzellen zur Zeit nicht bekannt.

HOG1 und *PBS2* wurden bis jetzt nicht als Gene beschrieben, welche für die Autophagie oder die Reifung der Proaminopeptidase I über den Cvt-Weg essentiell sind.

Auf dieser Grundlage wurde die Rolle von Hog1 für die Autophagie in der Hefe S. *cerevisiae* untersucht.

Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, ob *HOG1* essentiell an der Autophagie in Hefe beteiligt ist und wie eine Deletion von *HOG1* in der Hefe die Autophagie während nicht-letalem osmotischem Stress beeinflusst.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zunächst, dass die Deletion von *HOG1* in der Hefe zu einer Osmosensitivität dieser Zellen gegenüber hyperosmotischem Stress führt, der hingegen für WT-Zellen nicht letal ist (Abb. 9). Im Vergleich zu WT-Zellen sind *hog1*∆-Zellen nicht dazu in der Lage, hyperosmotischen Stress (> 500 mosmol/L) längere Zeit zu überleben [132] (Abb. 9).

Hog1 ist auch nicht essentiell für die Reifung der Proaminopeptidase I (proAPI) über den Cvt-Weg (Abb. 10). *Hog1*∆-Zellen können reife Aminopeptidase I ungestört synthetisieren. Auch hypoosmotische Exposition hat hierauf keinen Einfluss (Abb. 10). Hog1 ist folglich weder essentiell für die Induktion des Cvt-Weges, noch für die Reifung der proAPI. Der Mechanismus der proAPI-Reifung ist bei Vorliegen einer *HOG1*-Deletion, im Gegensatz zur Autophagie (diese Arbeit), nicht sensitiv gegenüber hypoosmotischem Stress. Es besteht also eine Osmosensitivität der Autophagie, nicht aber der proAPI-Reifung.

Beide Transportwege nutzen sehr ähnliche Proteinkomponenten für den Import in die Vakuole [20, 21]. Unter nährstoffreichen Bedingungen hemmt Tor (*target of rapamycin*) die Autophagie und unreife Aminopeptidase I wird über den Cvt-Weg in die Vakuole transportiert. Eine Inhibition von Tor durch N-Mangel oder Gabe von Rapamycin bewirkt hingegen die Induktion der Autophagie (siehe auch Kapitel 1.2.2). Der Wechsel zwischen dem Cvt-Weg und der autophagischer Proteolyse wird folglich über Tor moduliert (siehe auch Kapitel 1.2.3).

Die Stimulation der Bildung von autophagischen Vesikeln durch Inkubation der Zellen in N-freiem Medium ist in WT- und *HOG1*-Deletionsstamm qualitativ und quantitativ vergleichbar. In der Vakuole beider Hefestämme sind nach 4 h N-Mangel deutlich Vesikel erkennbar (Abb. 11). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Hog1 nicht essentiell für die Autophagie ist, denn *hog1* Δ -Zellen zeigen

keinen Defekt in der Bildung von Autophagosomen sowie ihrem Transport zur Vakuole.

Für eine direkte Untersuchung des autophagischen Proteintransports wurde das GFP-markierte Protein Atg8 als Marker verwendet (Abb. 8). Atg8 assoziiert spezifisch mit den Autophagosomen. Es ist sowohl innerhalb als auch außerhalb der autophagischen Vesikel nachweisbar (Transmembranprotein) [91, 105]. Die Autophagie ist verantwortlich für den Hauptanteil der intrazellulären Proteindegradation in der Vakuole. Dieser Mechanismus wird induziert, wenn extrazelluläre Nährstoffe in vermindertem Maße vorliegen, die Zellen also hungern. Über die Autophagie wird unselektiv zytoplasmatisches Material (auch ganze Zellorganellen) in Vesikel, den Autophagosomen, eingeschlossen, zur Vakuole transportiert und dort degradiert. Die resultierenden Aminosäuren werden wiederum für die Proteinsynthese zur Verfügung gestellt. Es handelt sich also bei der Autophagie um einen zentralen Mechanismus, der unter Hunger- oder anderen Stressbedingungen eine gleichbleibende Proteinsynthese essentieller Funktions- oder Struktur-Proteine gewährleisten kann [133, 134]. Eine gleichbleibende Proteolyseaktivität während und nach der Adaptation an veränderte Umweltbedingungen ist dementsprechend essentiell für das Überleben von Hefezellen. Fast jeder bisher nachgewiesene Defekt in der Autophagie führt in Hefezellen zu einem Vitalitätsverlust während Inkubation in N-freiem Medium, was darauf hinweist, dass dieser Mechanismus dazu beiträgt, Aminosäuren zum Überleben der Zelle während einer Hungerphase bereitzustellen [32].

Anlehnend an die autophagische Proteolyse in der Säugerleber, die unter anderem über den zellulären Hydratationszustand p38^{MAPK}-abgängig reguliert wird [71], wurde die Rolle von Hog1 für die Autophagie der Hefe während osmotischem Stress untersucht. Die, in dieser Arbeit verwendeten, anisoosmotischen Inkubationsbedingungen von 30 bis 500 mosmol/L beeinträchtigen die Vitalität der untersuchten *HOG1*-defizienten Zellen nicht (Abb. 13). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Aktivität der Autophagie in den verwendeten Hefezellen bei moderatem osmotischem Stress von 30 bis 500 mosmol/L untersucht.

Die vorliegenden Versuche mit Osmolaritätsreihen (Abb. 15 B) werfen sogar die Frage auf, ob Hog1 in der Hefe bei osmotischem Stress zur normalen Vitalität durch eine adaptive Funktion in Bezug auf die Autophagie entscheidend beiträgt (osmoprotektiver Effekt von Hog1 via Autophagie) und ob neben der etablierten

Diskussion

Funktion von Hog1 (Induktion der Glycerinsynthese) die direkte Modulation der Autophagie auch von Bedeutung für die Osmoprotektion ist. Die Modulation der Autophagie über Hog1 scheint folglich ein Element der Stressabwehr zu sein.

HOG1- und *PBS2-*defiziente Hefezellen zeigen eine Aktivitätsminderung der autophagischen Proteolyse, sobald sie hypo- oder hyperosmotischem Stress ausgesetzt werden (Abb. 15 B und Abb. 19).

Da die Autophagieaktivität bei einer Osmolarität von 150 mosmol/L in allen untersuchten Hefestämmen ein Optimum erreichte (Abb. 15 B), wurde dieser Bereich als normotones, also osmotisches Optimum angenommen. In der Hefe liegen bisher keine Untersuchungen zur Beziehung zwischen dem Grad der Autophagieaktivität und der Umgebungsosmolarität vor. Aussagen hierzu wurden in der vorliegenden Dissertation erarbeitet.

Sowohl in $hog1\Delta$ -Zellen als auch in $pbs2\Delta$ -Zellen liegt während normoosmotischer Inkubation kein Autophagiedefekt vor. Die GFP-Atg8 Degradation via Autophagie kann in den untersuchten Zellen durch Inkubation in N-freiem Medium innerhalb von Minuten induziert werden und steigt nahezu linear über 8 h an (Abb. 14 und Abb. 19).

Die Deletion von *HOG1* führt hingegen zur Osmosensitivität der Autophagie, sobald die Hefe hyper- oder hypoosmotischen Bedingungen ausgesetzt ist. Folglich stabilisiert das Protein Hog1 die Autophagie während osmotischem Stress in WT-Zellen.

Ebenso wie die GFP-Atg8-Degradation bzw. die Autophagieaktivität, weist auch die Proteolyserate in $hog1\Delta$ -Zellen eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des osmotischen Stresses und der Proteolyseaktivität unter anisoosmotischen Inkubationsbedingungen auf (Abb. 17). Der Einsatz dieser unterschiedlichen Methoden war erforderlich, um herauszuarbeiten, dass nicht nur die Induktion von Atg8, sondern hier auch der tatsächliche Iysosomale Proteinabbau in der Vakuole untersucht wurde. Bei der gezeigten Osmosensitivität nach Deletion von HOG1 handelt es sich also um einen echten Autophagiedefekt.

Die Identifikation von Hog1 und voraussichtlich auch Pbs2 als Autophagierelevante Proteine ist also eine Parallele zur Leber, wenn auch mit unterschiedlichen Auswirkungen.

5.1.1 Wie wird die Osmosensitivität der Autophagie in *hog1*∆-Zellen während osmotischem Stress reguliert?

Die Autophagie in Hefe ist Hog1-kontrolliert. Wie sehen die hieran beteiligten Mechanismen aus?

Untersucht wurden hierbei nach Ausschluss unspezifischer Mechanismen, die Menge an gebildeten Autophagosomen, die Lipidierung von Atg8 sowie der Phosphorylierungsstatus von Atg13.

Zunächst wurde in Analogie zu Experimenten an der Säugerleber [135] versucht, unspezifische und toxische Effekte der verwendeten experimentellen anisoosmotischen Bedingungen auszuschließen.

Die Komplementation von hypoosmotischem N-freiem Medium mit NaCl oder Raffinose führt zu einer Wiederherstellung der Autophagieaktivität in *HOG1*defizienten Zellen auf das Kontrollniveau bei normoosmotischer Inkubation (Abb. 20 A). Außerdem führt die Supplementation von normoosmotischem Medium auf Hyperosmolarität mit Raffinose, Sorbitol oder (NH₄)₂SO₄ anstatt von NaCl ebenfalls zu einer reduzierten GFP-Atg8-Degradation in *hog1*∆-Zellen (Abb. 20 B). Der Defekt der autophagischen Proteolyse in *HOG1*-defizienten Zellen bei osmotischem Stress ist also zum einen reversibel und hängt zum anderen von der extrazellulären Osmolarität ab, unabhängig von der Art der verwendeten osmotischen Substanz. Die Osmosensitivität der Autophagie ist daher unabhängig von der Verfügbarkeit von NaCl oder Nährstoffen. Es handelt sich also um ein echtes Adaptationsphänomen, d.h. die reversible Kopplung von Osmostress an einen Stoffwechselweg.

Grundsätzlich könnten angesichts der Mechanismen, die die Autophagie in Hefe steuern, Schritte oberhalb der Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) oder nachfolgende Schritte an der Regulation beteiligt sein (siehe Abb. 4).

Gegenwärtig ist der molekulare Mechanismus, wie Hog1 die Autophagie beeinflusst, noch weitgehend unverstanden. Weder die Lipidierung von Atg8 (Abb. 22) noch der Phosphorylierungsstatus von Atg13 (Abb. 23) werden durch osmotischen Stress beeinflusst.

Die Membranrekrutierung von Atg8-PE ist essentiell für die Segregation. Atg8 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das in einem der Ubiquitinierung ähnlichen Prozess mit Phosphatidylethanolamin (PE) durch eine Reihe posttranslationaler

Diskussion

Modifikationen mittels der Proteine Atg4 [43], Atg7 (E1) [136] und Atg3 (E2) [41] zu Atg8-PE konjugiert wird (Abb. 3). Das lipidierte Atg8 wird im Rahmen der Initiierung der Segregation selbst in die Autophagosomenmembran eingebaut und nach dem Vakuolenimport degradiert.

In hypo- oder hyperosmotisch exponierten $hog1\Delta$ -Zellen kann kein Defekt der Lipidierung von Atg8 festgestellt werden (Abb. 22). $Hog1\Delta$ -Zellen zeigen keine signifikant verringerten Atg8-PE Mengen im Vergleich zu WT-Zellen während einer anisoosmotischen Inkubation. Genauso ist der Phosphorylierungsstatus von Atg13 während osmotischem Stress in *HOG1*-defizienten Zellen unverändert (Abb. 23).

Unter physiologischen Bedingungen wird der Phosphorylierungsstatus von Atg13 durch die Verfügbarkeit einer N-Quelle reguliert [28, 29]. Unter nährstoffreichen Inkubationsbedingungen, welche den Transport der Proaminopeptidase I über den Cvt-Weg fördern, ist Atg13 hyperphosphoryliert, während unter N-Mangel die Autophagie aktiviert wird und die Phosphorylierung von Atg13 abnimmt (Dephosphorylierung) [28] (Abb. 1).

Lokalisationsexperimente mit Atg8/Atg9 zeigten, dass in *HOG1*-defizienten Zellen kein signifikanter Unterschied in der Bildung von PAS bzw. der Segregation im Vergleich zu WT-Zellen besteht. Atg9 ist ein Transmembranprotein, welches an der präautophagosomalen Struktur (PAS) lokalisiert ist und als Marker für PAS in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird (Kapitel 4.4.2).

Die Untersuchung zeigte, dass die Zahl fluoreszierender Strukturen im Zytoplasma von $hog1\Delta$ -Zellen während osmotischem Stress und N-Mangel nicht mit der Anzahl GFP-Atg9-assoziierter Signale übereinstimmte (Abb. 21). Eine gesteigerte Bildung von PAS in $hog1\Delta$ -Zellen bei anisoosmotischer Exposition kann damit weitgehend ausgeschlossen werden. Die verringerte Autophagieaktivität während osmotischem Stress in $hog1\Delta$ -Zellen lässt sich also nicht durch eine gestörte PAS-Bildung erklären. Die Segregation in den untersuchten Zellen ist daher unabhängig von osmotischem Stress.

Demzufolge liegen derzeit keine Argumente dafür vor, dass in *HOG1*-defizienten Zellen der Segregationsprozess selbst durch osmotischem Stress vermindert wird. Prä-Segregationsschritte als Regulationselement der Osmosensitivität der Autophagie sind eher unwahrscheinlich.

Diskussion

Dies ist ein entscheidender Unterschied zur Säugerleber, in der fast alle bisher bekannten Modulatoren der Autophagie (bis auf NH₄Cl, welches die Azidifizierung der Lysosomen verhindert) zur unmittelbaren Verminderung/Steigerung der mittels Elektronenmikroskopie erfassbaren Segregation führen [73, 79, 137-139].

Zur Funktionalität der Autophagosomen in Hefezellen bei osmotischem Stress kann allerdings anhand der verwendeten Techniken wenig ausgesagt werden. Es könnte theoretisch auch sein, dass funktionsunfähige Organellen synthetisiert werden, denen die Fähigkeit fehlt, intrazelluläres Material der Vakuole zur Degradation zuzuführen.

Alle Autophagie-spezifischen Mechanismen (oberhalb der Bildung der PAS), die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind offenbar nicht primär an der Regulation der Autophagie während osmotischem Stress beteiligt. Regulationsmechanismen der Autophagie unterhalb der PAS-Bildung sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Weitere Untersuchungen müssten sich also auf die postautophagosomale Prozessierung bzw. die daran beteiligten Proteine richten, wie z.B. dem Transport zur Vakuole (z.B. Sec12/16/23/24), der Fusion mit der Vakuole (z.B. Ccz1, Sec18, Sec17) und der intravakuolären pH-Regulation und Degradation (z.B. Pep4, Prb1/Cvt1) [140].

Die Proteine Msn2 und Msn4 haben sowohl für die Autophagie als auch für die Osmoprotektion von Hefezellen Bedeutung (Kapitel 1.4.1). Möglicherweise sind diese Proteine auch an der Regulation der Osmosensitivität der Autophagie beteiligt. Bisher ist nur ihre Funktion bei der Transkription von Stress-responsiven Genen und Osmoregulationsgenen, z.B. im HOG1-Weg [141], bekannt. Dies sind dort u.a GPD1 (Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase1) und GPP2 (Glycerol-3-Phosphat-Phosphatase2) [67]. Hungerbedingungen oder auch eine verringerte Tor-Aktivität durch Rapamycinzugabe führen in der Hefe zu einer verringerten Msn2/4-abhängigen Stressantwort. Dies führt zu einer gesteigerten Lebenserwartung in höheren Eukaryonten [142].

Die Proteine Msn2/4 könnten folglich auch bei der Expression von Autophagiespezifischen Genen (Atg) als Transkriptionsfaktoren fungieren und so die Verbindung zwischen den Stress-responsiven und Hunger-spezifischen Reaktionen der Zelle sein. Über eine Verbindung der Osmostress-responsiven Gene Msn2 und Msn4 zur autophagischen Proteolyse ist bisher nichts bekannt. In der Abb. 28 ist eine Arbeitshypothese dargestellt, die versucht die mögliche Rolle

von Msn2 und Msn4 als Regulationselement der Osmosensitivität der Autophagie darzustellen.

Während normaler Wachstumsbedingungen ist die Menge an gebildeten Msn2 und Msn4 im Zytosol gering, während in einer Stresssituation die Konzentration dieser Proteine durch vermehrte Expression schnell ansteigt. Die Proteine werden daraufhin vom Zytosol in den Zellkern transferiert [51]. Die Stabilisierung der Autophagie in WT-Zellen während osmotischem Stress könnte somit über die gesteigerte Genexpression von *MSN2/4* erfolgen. In WT-Zellen hemmt Tor außerdem die Bindung der Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 mit dem zytoplasmatischen Protein Bhm2 [143]. Bei Deletion von *HOG1* oder wahrscheinlich auch *PBS2* würden Msn2/4 dementsprechend nicht von Hog1 über Phosphorylierung aktiviert und nicht in den Zellkern transportiert. Dies würde die verringerte Autophagieaktivität in $hog1\Delta$ –/*pbs2*Δ-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen während osmotischem Stress erklären. Weitere Experimente zur Prüfung dieser Hypothese sind erforderlich.




Abb. 28: Die mögliche Rolle von Msn2 und Msn4 als Regulationselemente der Osmosensitivität der Autophagie.

Die Proteine Msn2 und Msn4 sind sowohl für die Autophagie als auch für die Osmoprotektion von Hefezellen von Bedeutung. Während normaler Wachstumsbedingungen ist die Menge an gebildetem Msn2 und Msn4 im Zytosol gering, während in einer Stresssituation die Konzentration dieser Proteine schnell ansteigt. Die Proteine werden daraufhin vom Zytosol in den Zellkern transferiert. Die Stabilisierung der Autophagie in WT-Zellen während osmotischem Stress könnte somit über die Kontrolle der Genexpression von *MSN2/4* erfolgen (Arbeitshypothese).

5.2 Die Deletion von *HOG1* führt zur Osmosensitivität der Hungerinduzierten, aber nicht der Rapamycin-induzierten Atg8-Degradation und Proteolyse

In Hefezellen sind sowohl die Inkubation in N-freiem Medium wie auch die Inkubation mit Rapamycin gängige Modelle zur Induktion einer gesteigerten Autophagie [13, 144-147].

Obwohl auch phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Modellen existieren (diese Arbeit) [113], gelten sie als experimentell gleichartig [146]: Aut-Mutanten sind weder zur Autophagie durch N-Mangel noch durch Rapamycin in der Lage [93, 148]. Nach Identifikation von Hog1 als Regulationselement der Autophagie in Hefe wurden mögliche Unterschiede in der Adaptation an osmotischen Stress zwischen der Hunger-induzierten und Rapamycin-induzierten autophagischen Autophagie bearbeitet.

Die Rapamycin-induzierte Autophagie in *hog1*∆-Zellen war überraschenderweise nicht osmosensitiv. Dieses Ergebnis stellt einen klaren Unterschied zur Hungerinduzierten Autophagie dar: Für diese besteht in *hog1*∆-Zellen zwischen dem Grad des osmotischen Stresses und der Hemmung der Autophagieaktivität unter anisoosmotischen Hungerbedingungen eine lineare Beziehung (Abb. 15 B).

Offenbar ist es so, dass sich die Hunger-induzierte von der Rapamycin-induzierten autophagischen Proteolyse im Hinblick auf die Osmosensitivität biochemisch unterscheidet, auch wenn beide Autophagieformen unter WT-Bedinungen phänotypisch und quantitativ (Bestimmung der Atg8-Degradation, Proteolysemessung, Fluoreszenzmikroskopie) vergleichbar sind (Abb. 17, 25 B, 26, 28).

In der Leber ist *mTOR* (<u>mammalian target of rapamycin</u>) an der Regulation der Autophagie beteiligt [134, 149]; es sind aber auch Tor-unabhängige Mechanismen bekannt [79, 150]. Während Rapamycin in Hefe eine Induktion der Autophagie bewirkt, ist es in der aminosäurefrei perfundierten Leber per se ohne Wirkung auf die autophagische Proteolyse [79]. Auf der anderen Seite ist Rapamycin nicht dazu in der Lage, die durch Hydratationsänderung bedingten Veränderungen der Proteolyseaktivität nennenswert zu beeinflussen [79].

Gegenwärtig ist in der Hefe noch nicht klar, in wie weit die Mechanismen der Autophagieinduktion durch Inkubation in N-freiem Medium oder Rapamycin

biochemisch voneinander abweichen. In der Hefe wäre vorstellbar, dass die beiden Signalwege zunächst zwar im Hinblick auf die Segregation konvergieren, Rapamycin dann weiter *downstream* von Hog1 eine Rolle spielt.

Die Spalthefe Schizosaccharomyces pombe besitzt zwei TOR-Homologe, TOR1 und TOR2. Trotz ihrer Strukturähnlichkeit besitzen diese beiden Gene jedoch verschiedene Funktionen. TOR1 wird unter Hungerbedingungen, extremer Temperatur, oxidativem Stress und osmotischem Stress benötigt, während TOR2 unter normalen Wachstumsbedingungen notwendig ist [151]. Die TORspezifischen Funktionen in der Hefe *S. pombe* werden nicht durch Rapamycin gehemmt.

Genetische Studien an der Hefe *S. cerevisiae* weisen ebenfalls zwei Hauptfunktionen von *TOR* nach, eine Rapamycin-sensitive und eine Rapamycinunsensitive [31]. Der Rapamycin-sensitive Tor1-Komplex reguliert verschiedene Aspekte des Zellmetabolismus, u.a. die Transkription von Stress-responsiven Genen über die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 und die Autophagie. Moduliert werden die Tor1-abhängigen Signalwege z.B. durch das Nährstoffangebot und osmotischen Stress.

Der Tor2-Komplex, der eine niedrige Sensitivität gegenüber Rapamycin besitzt, reguliert die Polarisation des Aktinzytoskeletts der Zelle. Über die spezifischen Induktionsmechanismen ist jedoch bisher wenig bekannt [31].

Die Möglichkeit der Existenz zweier Tor-Proteine in der Hefe könnte Hinweise darauf liefern, warum die Hunger-induzierte Autophagie osmosensitiv ist und die Rapamycin-induzierte Autophagie nicht. Die Induktion mittels Inkubation in Nfreiem Medium könnte den Signalweg über das Protein Tor2 aktivieren. Eine Induktion mittels Rapamycin könnte über den Tor1-abhängigen Signalweg erfolgen. Es ist momentan nicht bekannt, ob Tor2 bei der Induktion der Autophagie auch eine Rolle spielt.

Außerdem konnte bei Untersuchungen an der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Rapamycin in Hefezellen neben der Autophagie (Kapitel 1.2) auch die Apoptose induziert [152]. Eine Konzentration von 0,2 µg/ml Rapamycin im Inkubationsmedium, die auch in dieser Arbeit zur Induktion der Autophagie verwendet wurde, führt in WT-Zellen innerhalb von 100 min zur einer 50%-igen Mortalitätsrate. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, weswegen die Rapamycin-induzierte Autophagie unsensitiv auf weitere Stimuli ist (Kapitel 4.5).

Zusammenfassend sind in der Abb. 29 die in dieser Arbeit identifizierten Elemente der *HOG1*-abhängigen Regulation der Autophagie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt.



Abb. 29: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit identifizierten Elemente der HOG1abhängigen Regulation der Autophagie in der Hefe Saccharomyces cerevisiae. Aus [113].

5.3 Regulation der Proteolyse in Leber und Hefe - Parallelen und Unterschiede

Im Hinblick auf die Hunger-induzierte Proteolyse ergeben sich aus den beschriebenen Experimenten folgende Parallelen und Unterschiede zwischen perfundierter Rattenleber und Hefezellen.

perfundierter Rattenleber			Hefe		
Umgebungs- osmolarität	р38 ^{марк} - Inhibitor	Proteolyse- aktivität	Umgebungs- osmolarität	Stamm	Proteolyse- aktivität
normoosmolar	abwesend	\rightarrow	normoosmolar	WT	\rightarrow
	anwesend	\rightarrow		hog1 Δ	\rightarrow
hypoosmolar	abwesend	\downarrow	hypoosmolar	WT	\rightarrow
	anwesend	\rightarrow		hog1∆	\downarrow
hyperoosmolar	abwesend	\rightarrow	hyperosmolar	WT	\rightarrow
	anwesend	\rightarrow		hog1 Δ	\downarrow

Hunger-induzierte Proteolyseaktivität in ...

Tab. 17: Die Wirkung von osmotischem Stress und von p38^{MAPK}-Inhibitoren/*HOG1*-Deletion auf die Hunger-induzierte Proteolyse.

- 1 Steigerung der Proteolyseaktivität
- → keine Änderung der Proteolyseaktivität im Vergleich zur Kontrolle
- ↓ Verringerung der Proteolyseaktivität

Vergleicht man die bekannten Daten aus der Säugerleber [78, 79] mit den hier beschriebenen Ergebnissen in der Hefe, so zeigen sich einige Parallelen, aber auch deutliche Unterschiede in Bezug auf die Hunger-induzierte Proteolyseaktivität. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in WT-Hefezellen Inkubation in Nfreiem Medium zur Steigerung der autophagischen Proteolyseaktivität führte (Abb. 15 und 17). Dies stellt eine Parallele zur Säugerleber dar.

Hypoosmolarität (osmotischer Stress) während N-Mangel bewirkte keine signifikante Änderung der Proteolyseaktivität in wildtypischen Hefezellen (Abb. 15 und 17). Dieser Befund unterscheidet sich deutlich von dem in Leberzellen erhalten Befund (vgl. Tab. 17). In der perfundierten Rattenleber führt Hypoosmolarität zu einer Verringerung der Proteolyseaktivität [77, 79, 114, 118, 119].

Hyperosmolarität (osmotischer Stress) während N-Mangel bewirkte keine signifikante Änderung der Proteolyseaktivität in wildtypischen Hefezellen (Abb. 15 und 17). Dieser Effekt ist auch in der Leber zu beobachten [118, 120-122].

Der Einsatz von p38^{MAPK}-Inhibitoren ist in der Hefe nicht effektiv (Abb. 24). In der perfundierten Rattenleber führt die Zugabe von p38^{MAPK}-Inhibitoren zu keinem Effekt auf die Proteolyseaktivität.

Eine *HOG1*-Deletion hatte in Hefezellen keinen Einfluss auf die Proteolyseaktivität während Inkubation in normoosmotischem N-freiem Medium (Abb. 15 und 17), die basale Proteolyserate war quantitativ mit der bei WT-Zellen beobachteten vergleichbar (Abb. 26). In *hog1*∆-Zellen konnte eine Osmosensitivität der autophagischen Proteolyse während osmotischem Stress und N-Mangel nachgewiesen werden. In Säugerlebern war der antiproteolytische Effekt der Hypoosmolarität in Gegenwart von p38^{MAPK}-Inhibitoren aufgehoben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl in der Leber als auch in der Hefe die Proteolyse p38^{MAPK}-/Hog1-abhängig reguliert wird. Allerdings bestehen klare Unterschiede, was die jeweilige biologische Funktion von p38^{MAPK}/Hog1 betrifft: In der Hefe wirkt das Protein Hog1 als Stabilisator der Autophagie während osmotischem Stress. In der Leber besteht der regulatorische Effekt der p38^{MAPK} weniger in der Stabilisierung der Autophagie unter Hungerbedingungen, sondern hier stellt die p38^{MAPK} das zentrale Signalelement dar, das Zellvolumenänderungen, die durch eine Vielfalt von Agonisten und Umgebungsbedingungen moduliert werden, direkt in Zellantworten, die der Stoffwechseladapation dienen, umsetzt.

Diese klaren teleologischen Unterschiede werden im Folgenden (Kapitel 5.3.1) näher erläutert.

Vergleicht man die Rapamycin-induzierte Proteolyse mit der Hunger-induzierten Proteolyse in wildtypischen Hefezellen, so ergeben sich folgende Parallelen und Unterschiede zu Leberzellen.

Proteolyseaktivität in		
	perfundierter Rattenleber	Hefe
Rapamycin		
Normoosmolarität	\rightarrow	↑
+ Phenylalanin	n.b.	\rightarrow
+ NH₄CI	n.b.	\rightarrow
Hypoosmolarität	n.b.	\rightarrow
Hyperosmolarität	n.b.	\rightarrow
Inkubation in N-freiem Media	um	
Normoosmolarität	↑	↑
+ Phenylalanin	\downarrow	\downarrow
+ NH₄CI	\downarrow	\downarrow
Hypoosmolarität	\downarrow	\rightarrow
Hyperosmolarität	\rightarrow	\rightarrow

Tab. 18: Die Wirkung von osmotischem Stress, Aminosäuren und NH₄CI auf die Rapamycinund die Hunger-induzierte Proteolyseaktivität [56, 74, 77, 113, 117, 123].

- 1 Steigerung der Proteolyseaktivität
- → keine Änderung der Proteolyseaktivität im Vergleich zur Kontrolle
- ↓ Verminderung der Proteolyseaktivität
- n.b. nicht bestimmt

In der Hefe kann die autophagische Proteolyse durch Rapamycin induziert werden (Abb. 25 und 26), in der perfundierten Rattenleber hingegen hat Rapamycin keine proteolysestimulierende Wirkung.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass osmotischer Stress keinen Einfluss auf die Rapamycin-induzierte Proteolyse hatte (Abb. 25 und 26).

In Hefezellen konnte kein antiproteolytischer Effekt auf die Rapamycin-induzierte Proteolyse nachgewiesen werden (Tab. 15 und 16).

Wurde die Proteolyse in der Hefe durch Inkubation in N-freiem Medium induziert, hemmten Phenylalanin und NH₄Cl die GFP-Atg8-Degradation (Tab. 13). Dieses Verhalten ist dem Phenylalanineffekt in der Säugerleber vergleichbar: Phenylalanin und NH₄Cl hemmen die Proteolyse auch in der perfundierten Rattenleber.

Anhand der zusammengefassten Ergebnisse wird deutlich, dass in der Hefe zwei unabhängige Induktionswege der autophagischen Proteolyse/Autophagie existieren: Eine Phenylalanin- und NH₄CI-sensitive Form der Proteolyse, die durch N-Mangel induziert werden kann und eine Phenylalanin- und NH₄CI-unsensitive Proteolyse, die durch Rapamycin induziert wird.

5.3.1 Analogien der autophagischen Proteolyse zwischen Leber und Hefe

Ziel dieser Arbeit war unter anderem, Analogien der autophagischen Proteolyse zwischen Leber und Hefe herauszuarbeiten.

Der antagonisierende Einfluss von p38^{MAPK}-Inhibitoren auf hydratationsabhängige Regulationsmechanismen des Proteinabbaus ist seit langem aus Säugern bekannt [6] (Kapitel 4.4.4). Während Zellen in Abwesenheit von p38^{MAPK}-Hemmstoffen eine reversible Hemmung der Proteolyse durch unterschiedliche Bedingungen und Agonisten zeigen, die den zellulären Hydratationszustand steigern, ist dieser Effekt in Gegenwart dieser Inhibitoren vollständig aufgehoben. Die Proteolyse zeigt dann also eine Osmosensitivitätsresistenz. Die pharmakologische Inhibition der p38^{MAPK} in Hefe führte hier leider nicht weiter. Keiner der verwendeten p38^{MAPK}-Inhibitoren (SB 203580, SB 202190 und PD 169316) zeigt eine signifikant hemmende Wirkung auf die GFP-Atg8-Degradation in WT-Zellen bei anisoosmotischer Inkubation im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24). Gründe für die ausbleibende Hemmung könnten sein:

- 1. Die p38^{MAPK}-inhibitoren gelangen nicht durch die Zellwand der Hefe (Zellpermeabilität hier nicht nachweisbar).
- 2. Keine Wirkung von Säuger-spezifischen Inhibitoren in der Hefe (Speziesdivergenzen).

Da sich die Zellwand der Hefe strukturell und biochemisch sehr stark von der Zellmembran einer Leberzelle unterscheidet, ist die wahrscheinlichste Erklärung, dass die untersuchten p38^{MAPK}-Inhibitoren nicht in ausreichender Konzentration in die Hefezelle gelangen. Es ist nicht bekannt, ob die in Säugerzellen erprobten spezifischen Inhibitoren der p38^{MAPK} auch in Hefezellen wirken.

Die Deletion von Genen in der Hefe ist einer pharmakologischen Hemmung eines Proteins an Säuger vergleichbar.

Die antiproteolytische Wirkung von Phenylalanin und NH₄Cl ist ebenfalls aus Proteolysemessungen in der perfundierten Rattenleber bekannt (Kapitel 4.6).

Diese Arbeit zeigt, dass die Hunger-induzierte GFP-Atg8-Degradation in der Hefe sowohl durch Phenylalanin als auch NH₄Cl gehemmt wird (Tab. 13). Dieses

Ergebnis ist unabhängig vom Genotyp der untersuchten Hefezellen. In der antiproteolytischen Wirkung von Phenylalanin und NH₄CI in der Hefe zeigt sich also eine deutliche Parallele zu Säugerzellen.

Mittels entsprechender Proteolyseaktivitätsmessungen wird die antiproteolytische Wirkung von Phenylalanin und NH₄CI ebenfalls nachgewiesen.

Außerdem kann in dieser Arbeit belegt werden, dass in der Hefe weder Phenylalanin noch NH₄CI eine agonistische Wirkung auf die Rapamycin-induzierte GFP-Atg8-Degradation haben (Tab. 15). Dieses Ergebnis wird durch entsprechende Proteolysemessungen bestätigt (Tab. 16).

Die gerade beschriebenen Ergebnisse sind ein weiter Hinweis darauf, dass sich die Hunger-induzierte von der Rapamycin-induzierten Autophagie biochemisch unterscheidet. Es bestehen deutliche Unterschiede in der Adaptation an osmotischen Stress zwischen der durch Hunger- und Rapamycin-induzierten autophagischen Proteolyse.

Auch an dieser Stelle könnte das in Kapitel 5.2 bereits beschriebene Vorkommen zweier Tor-Proteine und dementsprechender unabhängiger Signalwege die Erklärung dafür liefern, weswegen die Hunger-induzierte Autophagie Phenylalanin- und NH₄Cl-sensitiv zu sein scheint, die Rapamycin-induzierte Autophagie dagegen nicht. Die Induktion mittels Inkubation in N-freiem Medium könnte den Signalweg über das Protein Tor2 aktivieren. Eine Induktion mittels Rapamycin könnte über den Tor1-abhängigen Signalweg erfolgen.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass Hog1 eine andere Funktion bei der Regulation der Autophagie in Hefe hat als die Säuger p38^{MAPK} für die Proteolyse in der Leber.

In der Leber führt die Aktivierung der p38^{MAPK} durch Hypoosmolarität zu einer Verringerung der Autophagie [79], während die Hemmung der p38^{MAPK} zu einer Stimulation der Autophagie während osmotischem Stress führt. In der Hefe bewirkt die Deletion von *HOG1* eine Inhibition der Autophagie während hypo- und hyperosmotischem Stress [56].

Offenbar teilen die beiden Spezies allgemein das Vorhandensein von "Osmosignalling"-Mechanismen, die mit Hog1 bzw. der p38^{MAPK} gekoppelt sind, sich aber biochemisch im Ergebnis unterscheiden.

Eine Erklärung könnte das Vorhandensein von Integrinrezeptoren in Leberzellen sein, welche in der Hefe nicht vorhanden sind, sich folglich später in der Evolution entwickelt haben [153]. In Leberzellen findet das "Osmosignalling" über Integrinrezeptoren und die Src-Kinase statt [71, 130]. In der Hefe sind die genauen Mechanismen der Wahrnehmung von osmotischen Veränderungen in der extrazellulären Umgebung noch nicht vollständig verstanden.

Man kann vermuten, dass in der Hefe Hog1 dazu dient ein Überleben der Zellen zu sichern, indem es die Autophagie während osmotischem Stress aufrecht erhält und stabilisiert, wohingegen in Säugerzellen die p38^{MAPK}, als ein Haupt-Regulationsprotein, die Autophagie über den zellulären Hydratationsstatus moduliert [28]. Die Hydratation von Leberzellen wird konstant moduliert und kann durch eine Reihe von Umwelteinflüssen verändert werden, wie z.B. Hormone, Aminosäuren und Zytokine. In der Hefe ist jedoch nicht bekannt, ob die Osmoregulationsmechanismen vorhandenen vollständigen zu einer Wiederherstellung des ursprünglichen Zellvolumens nach einem osmotischen Schock führen. Es könnten auch an der Hefezelle, ebenso wie in Leberzellen, dauerhafte Schwellungs- bzw. Schrumpfungszustände erzeugt werden, die die Proteolyseaktivität beeinflussen [113].

In der Hefe unterscheiden sich die Mechanismen der Autophagieinduktion durch Inkubation in N-freiem Medium oder Rapamycin biochemisch in ihrer Sensitivität gegenüber osmotischem Stress [113]. Außerdem konnte eine Sensitivität der Hunger-induzierten autophagischen Proteolyse gegenüber Phenylalanin und NH₄CI gezeigt werden (diese Arbeit), die in Leberzellen ebenfalls nachweisbar ist [81]. Die Rapamycin-induzierte Autophagie ist nicht Phenylalanin- und NH₄CIsensitiv (diese Arbeit).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können die Mechanismen der Autophagieinduktion durch Inkubation in N-freiem Medium oder Rapamycin in der Hefe als unabhängige Funktionseinheiten gesehen werden. Durch Rapamycin ist eine starke Induktion der Autophagie in der Hefe möglich (Abb. 27). In der perfundierten Rattenleber hat es nahezu keinen Effekt [79]. Obwohl offenbar eine Ähnlichkeit in der Phenylalanin- und NH₄CI-Sensitivität der Hunger-induzierten autophagischen Proteolyse zwischen Leber und Hefe vorliegt, kann in der Leber keine Parallele zur Rapamycin-induzierten Autophagie der Hefe gezogen werden.

Der genaue Stellenwert der hier dargestellten Ergebnisse kann erst in der Zukunft bestimmt werden, da erstens der Mechanismus der Regulation der Autophagie über Hog1 noch nicht bekannt ist und zweitens bisher weitere Parallelen zu höheren Organismen fehlen.

Die beschriebenen Analogien zwischen Leber und Hefe könnten ein molekulares Werkzeug zur weiteren Aufklärung der pathophysiologischen Grundlagen kataboler Krankheitszustände bei höheren Organismen sein.

Mit der abschließenden Abb. 30 wurde versucht eine zusammenfassende Übersicht über die erarbeiteten Ergebnisse zu geben. Die Ergebnisse wurden graphisch in einen Zusammenhang gestellt und die entsprechenden Kapitel des Ergebnisteils aufgelistet (Abb. 30 A).

Die vorliegenden Ergebnisse sind von Bedeutung, da es sich bei der Induktion der Autophagie durch Rapamycin um ein gängiges experimentelles Modell handelt. Die Intensität der Rapamycin-induzierten Proteolyse gegenüber Phenylalanin und NH₄CI wirft allerdings die Frage auf, ob es sich bei der Rapamycin-induzierten Form der Autophagie wirklich um vakuolären Abbau von Zytoplasma und zytoplasmatischen Organellen durch vakuoläre Enzyme handelt. Hier sollte, da NH₄CI die Zellwand der Hefe leicht permeiert, eine klare Hemmung zu beobachten sein. Auch die vakuolären Proteinasen der Hefe arbeiten nur bei saurem pH. NH₄CI führt aber zu einer sofortigen intrazellulären Adzidifizierung.



Α





Abb. 30: Übersicht über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

In dieser Abbildung sind die erarbeiteten Ergebnisse in der Hefe *S. cerevisiae* im Zusammenhang dargestellt und die entsprechenden Kapitel des Ergebnisteils aufgelistet (**A**). In Abb. 30 **B** befindet sich eine entsprechende Darstellung für die Säugerleber (siehe Kapitel 1.5).

- 1 Steigerung der Proteolyseaktivität
- → keine Änderung der Proteolyseaktivität im Vergleich zur Kontrolle
- ↓ Verringerung der Proteolyseaktivität

Zusammenfassung

VI Zusammenfassung

Die autophagische Proteolyse, d.h. der Proteinabbau durch Autophagosomen, ist der wichtigste katabole Mechanismus in Leberzellen. Sie wird durch Aminosäuren, Hormone, den intrazellulären ATP-Gehalt und durch den Hydratationszustand in p38^{MAPK}-abhängiger Weise reguliert. Das Protein Hog1 ist das Hefeanalogon zur Säuger-p38^{MAPK} und ist ebenso wie das Protein Pbs2 essentiell für das Überleben von Hefezellen bei osmotischem Stress. Ein Säugeranalogon zu Pbs2 ist bisher noch unbekannt. In der Hefe kann Autophagie entweder durch Inkubation in N-freiem Medium oder Zugabe von Rapamycin induziert werden. Es wurde die Rolle von *HOG1* und *PBS2* für die Regulation der Autophagie in Hefe sowie die zugrundeliegenden Mechanismen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Deletion von HOG1 oder PBS2 zur reversiblen Osmosensitivität der autophagischen Proteolyse während der Inkubation in anisoosmotischem N-freiem Medium führt. Dies gilt sowohl für hypo- als auch nicht-letalen hyperosmotischen Stress. Der Cvt-Weg wie auch die Vitalität von Hefezellen sind im untersuchten Osmolaritätsbereich (30-500 mosmol/L) sowohl in WT- als auch *hog1*^Δ-Zellen unbeeinträchtigt. Die Aktivität der autophagischen Proteolyse in *hog1*^Δ-Zellen ist von der extrazellulären Osmolarität abhängig, zeigt ein Optimum bei ca. 150 mosmol/L, ist reversibel und kein Sekundärphänomen eines Salz- oder Nährstoffmangels. Stromaufwärts von Hog1 wird dieser Mechanismus über Pbs2, nicht aber durch SIn1. mediiert. Der Phosphorylierungsstatus von Atg13 oder der Atg8-Lipidierungsstatus ist unter den oben genannten anisoosmotischen Bedingungen, sowohl in WT- als auch in *hog1*^Δ-Zellen unverändert, scheint also beim "Osmosignalling" nicht beteiligt zu sein. Die präautophagosomale Struktur (PAS), scheint auch nicht primär Zielstruktur der Hog1-abhängigen Regulation der Autophagie zu sein.

Im Gegensatz zur durch N-Mangel induzierten Autophagie ist die Rapamycininduzierte Autophagie bei Deletion von *HOG1* oder *PBS2* nicht osmosensitiv. Phenylalanin und NH₄Cl, die in der Säugerleber einen antiproteolytischen Effekt aufweisen, wirken auf die durch N-Mangel induzierte Autophagie in der Hefe ebenfalls antiproteolytisch, nicht aber auf die Rapamycin-induzierte Autophagie.

Die Rapamycin-induzierte Autophagie muss offenbar biochemisch und phänotypisch klar gegenüber der Autophagie bei N-Mangel abgegrenzt werden.

Es kann spekuliert werden, dass die Hog1-abhängige Stimulation der Autophagie in Hefe bei N-Mangel dazu dient, das Überleben während osmotischem Stress zu sichern. Das Hefesystem erlaubt möglicherweise eine Identifikation und Charakterisierung der in der Leber für die Autophagie wichtigen molekularen Komponenten. Die beschriebene Analogie zwischen Leber und Hefe könnte ein molekulares Werkzeug zur Aufklärung der pathophysiologischen Grundlagen kataboler Krankheitszustände bei höheren Organismen sein.

VII Abstract

In mammalian liver, proteolysis is regulated by amino acids, hormones, the intracellular ATP-content and the cellular hydration state in a microtubule- and p38^{MAPK}-dependent fashion. Osmosensing in liver cells towards proteolysis is achieved by activation of integrin receptors. The yeast orthologue of p38^{MAPK} is Hog1. Hog1 as well as Pbs2 are proteins with MAP kinase activity. Pbs2 is located upstream of Hog1 in the hyperosmotic response pathway (*HOG1* pathway) in yeast. A mammalian orthologue of Pbs2 is still unknown.

The present study adressed the question, if in yeast, autophagy-regulating mechanisms similar to those in liver cells could be identified. For this, methods involving fluorescence microscopy, molecular biology and tracer methods for determination of autophagy and proteolysis were applied.

Hog1 Δ and *pbs2* Δ cells exhibited a visible decrease of autophagy in hypoosmotic and hyperosmotic nitrogen-starvation medium as compared to normoosmolarity, as determined by GFP-Atg8 fluorescence. Western blot analysis of GFP-Atg8 degradation showed that WT cells maintained a stable autophagic activity over a broad osmolarity range, whereas *HOG1*-deleted cells and *PBS2*-deleted cells showed an impaired autophagic actitivity during hypo- and hyperosmotic stress. In [³H] leucine-prelabelled yeast cells, proteolysis rate was osmodependent only in *HOG1*-deleted cells. Hog1 is not essential for yeast autophagy during normoosmotic starvation conditions. On the other hand, the deletion of *HOG1* and *PBS2* impairs the stimulation of autophagic activity during osmotic stress. Neither phosphorylation status of Atg13 nor Atg8 lipidation seem to explain this adaptation. In contrast to starvation conditions, rapamycin-induced autophagy did not significantly respond to hypoosmotic or hyperosmotic stress in *hog1* Δ or WT cells.

We conclude that Hog1 plays a role in the stabilisation machinery of nitrogendeprivation-induced autophagy in yeast cells during ambient osmolarity changes. This could be an analogy to the p38^{MAPK}-pathway in mammalian liver, where osmosensing towards p38^{MAPK} is required for autophagy regulation by hypoosmotic or amino acid-induced cell swelling. A phenotypic difference is observed in rapamycin-induced autophagy, which does not seem to respond to

extracellular osmolarity changes in $hog1\Delta$ cells. Further characterization by classical modulators of autophaghy showed that both mechanisms of autophagy induction should be seen as biochemically different entities.

Identification of molecular mechanisms of autophagy regulation in yeast could be helpful to elucidate the signalling mechanisms of catabolic states in human disease.

VIII Literatur

- Noda, T., Suzuki, K. and Ohsumi, Y. (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. Trends Cell Biol 12, 231-235
- Klionsky, D. J. (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions.
 J Cell Sci 118, 7-18
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U. and Cuervo, A. M. (2006) Oxidative stress and autophagy.
 Antioxid Redox Signal 8, 152-162
- Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2005) Autophagosomes: biogenesis from scratch?
 Curr Opin Cell Biol 17, 415-422
- 5 Cuervo, A. M. (2003) Autophagy and aging--when "all you can eat" is yourself.
 Sci Aging Knowledge Environ 2003, 25
- vom Dahl, S., Schliess, F., Graf, D. and Häussinger, D. (2001) Role of p38(MAPK) in cell volume regulation of perfused rat liver.
 Cell Physiol Biochem 11, 285-294
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice.
 J Cell Biol 169, 425-434
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes.
 Dev Cell 5, 539-545
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.
 Science 290, 1717-1721
- 10 Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryot Cell** 1, 11-21
- Seglen, P. O. and Bohley, P. (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms.
 Experientia 48, 158-172

- 12 Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. Annu Rev Cell Biol 5, 483-525
- Thumm, M. (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy.
 Microsc Res Tech 51, 563-572
- 14 Klionsky, D. J., Nelson, H., Nelson, N. and Yaver, D. S. (1992) Mutations in the yeast vacuolar ATPase result in the mislocalization of vacuolar proteins. J Exp Biol 172, 83-92
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992)
 Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction.
 J Cell Biol 119, 301-311
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. and Ohsumi, Y. (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization.
 J Cell Biol 124, 903-913
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
 FEBS Lett 333, 169-174
- Noda, T., Matsuura, A., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1995) Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
 Biochem Biophys Res Commun 210, 126-132
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. and Wolf, D. H. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
 FEBS Lett 349, 275-280
- 20 Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Morano, K. A., Noda, T., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (1996) Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 12304-12308
- Harding, T. M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M. and Klionsky, D. J. (1996) Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway.
 J Biol Chem 271, 17621-17624
- Levine, B. and Klionsky, D. J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.
 Dev Cell 6, 463-477

- Shintani, T. and Klionsky, D. J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword.
 Science 306, 990-995
- 24 Klionsky, D. J. (1998) Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. J Biol Chem 273, 10807-10810
- Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm.
 Annu Rev Cell Dev Biol 15, 1-32
- 26 Ohsumi, Y., Ohsumi, M. and Baba, M. (1993) [Autophagy in yeast]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso** 38, 46-52
- Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.
 Gene 192, 207-213
- Scott, S. V., Nice, D. C., 3rd, Nau, J. J., Weisman, L. S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (2000) Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting.
 J Biol Chem 275, 25840-25849
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex.
 J Cell Biol 150, 1507-1513
- Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.
 J Biol Chem 273, 3963-3966
- de Virgilio, C. and Loewith, R. (2006) The *TOR* signalling network from yeast to man.
 Int J Biochem Cell Biol 38, 1476-1481
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast.
 J Cell Biol 147, 435-446
- 33 Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H. and Thumm, M. (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. Embo J 17, 3597-3607
- Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2003) Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy.
 Int J Biochem Cell Biol 35, 553-561

- Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells.
 Cell Struct Funct 27, 421-429
- Khalfan, W. A. and Klionsky, D. J. (2002) Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*.
 Curr Opin Cell Biol 14, 468-475
- Huang, W. P. and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery.
 Cell Struct Funct 27, 409-420
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy.
 Nature 395, 395-398
- Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway.
 Embo J 18, 3888-3896
- 40 Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. and Ohsumi, Y. (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5.Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. **J Biol Chem** 277, 18619-18625
- 41 Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. Nature 408, 488-492
- 42 Kim, J., Huang, W. P. and Klionsky, D. J. (2001) Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. J Cell Biol 152, 51-64
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway.
 J Cell Biol 151, 263-276
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.
 Embo J 19, 5720-5728

- 45 Brown, A. D. and Edgley, M. (1979) Osmoregulation in yeast. Basic Life Sci 14, 75-90
- 46 Ruis, H. and Schuller, C. (1995) Stress signaling in yeast. **Bioessays** 17, 959-965
- Wojda, I., Alonso-Monge, R., Bebelman, J. P., Mager, W. H. and Siderius, M. (2003) Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways.
 Microbiology 149, 1193-1204
- Chowdhury, S., Smith, K. W. and Gustin, M. C. (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation.
 J Cell Biol 118, 561-571
- Varela, J. C., Praekelt, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J. and Mager, W. H. (1995) The Saccharomyces cerevisiae HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A.
 Mol Cell Biol 15, 6232-6245
- 50 Hohmann, S. and Mager, W. H. (2003) Yeast Stress Responses. Springer-Verlag, Heidelberg
- 51 Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev** 62, 1264-1300
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Häussinger, D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.
 Physiol Rev 78, 247-306
- Norbeck, J. and Blomberg, A. (1996) Protein expression during exponential growth in 0.7 M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*.
 FEMS Microbiol Lett 137, 1-8
- Meikle, A. J., Reed, R. H. and Gadd, G. M. (1988) Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*.
 J Gen Microbiol 134, 3049-3060
- Slaninova, I., Sestak, S., Svoboda, A. and Farkas, V. (2000) Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*.
 Arch Microbiol 173, 245-252

- 56 Prick, T., Thumm, M., Köhrer, K., Häussinger, D. and vom Dahl, S. (2006) In yeast, loss of Hog1 leads to osmosensitivity of autophagy.
 Biochem J 394, 153-161
- 57 Blomberg, A. and Adler, L. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. Adv Microb Physiol 33, 145-212
- Andre, L., Hemming, A. and Adler, L. (1991) Osmoregulation in Saccharomyces cerevisiae. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺).
 FEBS Lett 286, 13-17
- Blomberg, A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model.
 FEMS Microbiol Lett 182, 1-8
- 60 Denkert, C., Warskulat, U., Hensel, F. and Häussinger, D. (1998) Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38^{MAPK} in hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters. **Arch Biochem Biophys** 354, 172-180
- 61 Kurz, A. K., Schliess, F. and Häussinger, D. (1998) Osmotic regulation of the heat shock response in primary rat hepatocytes. **Hepatology** 28, 774-781
- Blomberg, A. and Adler, L. (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of Saccharomyces cerevisiae.
 J Bacteriol 171, 1087-1092
- 63 Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E. and Gustin, M. C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science** 259, 1760-1763
- 64 Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E. and Gustin, M. C. (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway.
 Biol Chem 270, 30157-30161
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C. and Saito, H. (1996) Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1*-YPD1-SSK1 "twocomponent" osmosensor.
 Cell 86, 865-875

- Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A. G., Mattison, C. and Ota, I. (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1.
 J Biol Chem 272, 17749-17755
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts.
 Microbiol Mol Biol Rev 66, 300-372
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. and Ruis, H. (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene.
 Embo J 13, 4382-4389
- Toone, W. M. and Jones, N. (1998) Stress-activated signalling pathways in yeast.
 Genes Cells 3, 485-498
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B. and Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*.
 J Biol Chem 273, 22480-22489
- vom Dahl, S., Dombrowski, F., Schmitt, M., Schliess, F., Pfeifer, U. and Häussinger, D. (2001) Cell hydration controls autophagosome formation in rat liver in a microtubule-dependent way downstream from p38^{MAPK} activation.
 Biochem J 354, 31-36
- Wilkinson, K. D. (1995) Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation.
 Annu Rev Nutr 15, 161-189
- Mortimore, G. E., Poso, A. R., Kadowaki, M. and Wert, J. J., Jr. (1987) Multiphasic control of hepatic protein degradation by regulatory amino acids. General features and hormonal modulation.
 J Biol Chem 262, 16322-16327
- Mortimore, G. E. and Schworer, C. M. (1977) Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver.
 Nature 270, 174-176
- Schworer, C. M., Shiffer, K. A. and Mortimore, G. E. (1981) Quantitative relationship between autophagy and proteolysis during graded amino acid deprivation in perfused rat liver.
 J Biol Chem 256, 7652-7658

- Seglen, P. O. and Solheim, A. E. (1977) Protein degradation in isolated rat hepatocytes.
 Acta Biol Med Ger 36, 1789-1804
- vom Dahl, S. and Häussinger, D. (1996) Nutritional state and the swellinginduced inhibition of proteolysis in perfused rat liver.
 J Nutr 126, 395-402
- vom Dahl, S., Schliess, F., Reissmann, R., Görg, B., Weiergräber, O., Kocalkova, M., Dombrowski, F. and Häussinger, D. (2003) Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver.
 J Biol Chem 278, 27088-27095
- Häussinger, D., Schliess, F., Dombrowski, F. and vom Dahl, S. (1999) Involvement of p38^{MAPK} in the regulation of proteolysis by liver cell hydration.
 Gastroenterology 116, 921-935
- vom Dahl, S., Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W. and Häussinger, D. (1991) Regulation of liver cell volume and proteolysis by glucagon and insulin.
 Biochem J 278 (Pt 3), 771-777
- 81 vom Dahl, S. and Häussinger, D. (1995) Cell hydration and proteolysis control in liver.
 Biochem J 312 (Pt 3), 988-989
- Ogier-Denis, E. and Codogno, P. (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer.
 Biochim Biophys Acta 1603, 113-128
- 83 Rudnick, D. A. and Perlmutter, D. H. (2005) Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. **Hepatology** 42, 514-521
- Suzuki, T., Nakagawa, M., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Nishino, I., Ishiura, S. and Nonaka, I. (2002) The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy.
 J Biochem (Tokyo) 131, 647-651
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J. and Rubinsztein, D. C. (2004) Inhibition of *mTOR* induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet 36, 585-595

- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S. and Yoshimori, T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*.
 Science 306, 1037-1040
- Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M. and Thumm, M. (2000)
 Autophagy and the cvt pathway both depend on *AUT9*.
 J Bacteriol 182, 2125-2133
- Hanahan, D. and Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density.
 Methods Enzymol 100, 333-342
- Biggin Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. and Hegemann, J. H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast.
 Nucleic Acids Res 30, 23
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*.
 Yeast 10, 1793-1808
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi,
 Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation.
 Embo J 20, 5971-5981
- Tucker, K. A., Reggiori, F., Dunn, W. A., Jr. and Klionsky, D. J. (2003)
 Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy.
 J Biol Chem 278, 48445-48452
- Meiling-Wesse, K., Barth, H., Voss, C., Eskelinen, E. L., Epple, U. D. and Thumm, M. (2004) Atg21 is required for effective recruitment of Atg8 to the preautophagosomal structure during the Cvt pathway.
 J Biol Chem 279, 37741-37750
- 94 Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14, 953-961
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
 J Mol Biol 98, 503-517

- 96 Sambrook, J. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 97 Yaffe, M. P. and Schatz, G. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast.
 Proc Natl Acad Sci U S A 81, 4819-4823
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
 Nature 227, 680-685
- 99 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
 Proc Natl Acad Sci U S A 76, 4350-4354
- Clotet, J., Escote, X., Adrover, M. A., Yaakov, G., Gari, E., Aldea, M., de Nadal, E. and Posas, F. (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity.
 Embo J 25, 2338-2346
- de Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P. M., Sumoy, L., Mas, G. and Posas, F. (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes.
 Nature 427, 370-374
- de Nadal, E., Casadome, L. and Posas, F. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase.
 Mol Cell Biol 23, 229-237
- 103 Karlgren, S., Pettersson, N., Nordlander, B., Mathai, J. C., Brodsky, J. L., Zeidel, M. L., Bill, R. M. and Hohmann, S. (2005) Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmostress signaling.
 J Biol Chem 280, 7186-7193
- 104 Lee, S. J., Park, S. Y., Na, J. G. and Kim, Y. J. (2002) Osmolarity hypersensitivity of *HOG1* deleted mutants is suppressed by mutation in KSS1 in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 209, 9-14
- 105 Meiling-Wesse, K., Bratsika, F. and Thumm, M. (2004) ATG23, a novel gene required for maturation of proaminopeptidase I, but not for autophagy. **FEMS Yeast Res** 4, 459-465
- 106 Meiling-Wesse, K., Barth, H., Voss, C., Barmark, G., Muren, E., Ronne, H. and Thumm, M. (2002) Yeast Mon1p/Aut12p functions in vacuolar fusion of autophagosomes and cvt-vesicles. FEBS Lett 530, 174-180

- 107 Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L. and Thumm, M. (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole.
 J Bacteriol 183, 5942-5955
- 108 Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. Nature 418, 387-391
- 109 Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. (2005) Atg11 Links Cargo to the Vesicleforming Machinery in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. **Mol Biol Cell** 16, 1593-1605
- Young, P. R., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M. L., McNulty, D., Gallagher, T. F., Fisher, S., McDonnell, P. C., Carr, S. A., Huddleston, M. J., Seibel, G., Porter, T. G., Livi, G. P., Adams, J. L. and Lee, J. C. (1997) Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. J Biol Chem 272, 12116-12121
- 111 Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J. and O'Neill, E. A. (1998) The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. Biochemistry 37, 13846-13853
- 112 Gallagher, T. F., Seibel, G. L., Kassis, S., Laydon, J. T., Blumenthal, M. J., Lee, J. C., Lee, D., Boehm, J. C., Fier-Thompson, S. M., Abt, J. W., Soreson, M. E., Smietana, J. M., Hall, R. F., Garigipati, R. S., Bender, P. E., Erhard, K. F., Krog, A. J., Hofmann, G. A., Sheldrake, P. L., McDonnell, P. C., Kumar, S., Young, P. R. and Adams, J. L. (1997) Regulation of stressinduced cytokine production by pyridinylimidazoles; inhibition of CSBP kinase.

Bioorg Med Chem 5, 49-64

- 113 Prick, T., Thumm, M., Häussinger, D. and vom Dahl, S. (2006) Deletion of HOG1 leads to osmosensitivity in starvation-induced, but not rapamycindependent Atg8 degradation and proteolysis: further evidence for different regulatory mechanisms in yeast autophagy. Autophagy 2, 241-243
- 114 Hallbrucker, C., vom Dahl, S., Lang, F. and Häussinger, D. (1991) Control of hepatic proteolysis by amino acids. The role of cell volume. Eur J Biochem 197, 717-724
- Häussinger, D., Hallbrucker, C., vom Dahl, S., Decker, S., Schweizer, U., Lang, F. and Gerok, W. (1991) Cell volume is a major determinant of proteolysis control in liver.
 FEBS Lett 283, 70-72
- Häussinger, D., Hallbrucker, C., vom Dahl, S., Lang, F. and Gerok, W. (1990) Cell swelling inhibits proteolysis in perfused rat liver.
 Biochem J 272, 239-242
- Seglen, P. O. and Reith, A. (1977) Ammonia inhibits protein secretion in isolated rat hepatocytes.
 Biochim Biophys Acta 496, 29-35
- 118 Schliess, F. and Häussinger, D. (2003) Cell volume and insulin signaling. Int Rev Cytol 225, 187-228
- 119 vom Dahl, S., Stoll, B., Gerok, W. and Häussinger, D. (1995) Inhibition of proteolysis by cell swelling in the liver requires intact microtubular structures.
 Biochem J 308 (Pt 2), 529-536
- 120 Schliess, F., vom Dahl, S. and Häussinger, D. (2001) Insulin resistance induced by loop diuretics and hyperosmolarity in perfused rat liver. **Biol Chem** 382, 1063-1069
- Lordnejad, M. R., Schliess, F., Wettstein, M. and Häussinger, D. (2001) Modulation of the heme oxygenase HO-1 expression by hyperosmolarity and betaine in primary rat hepatocytes.
 Arch Biochem Biophys 388, 285-292
- 122 Schliess, F. and Häussinger, D. (2000) Cell hydration and insulin signalling. **Cell Physiol Biochem** 10, 403-408
- 123 vom Dahl, S. and Häussinger, D. (1998) Bumetanide-sensitive cell swelling mediates the inhibitory effect of ethanol on proteolysis in rat liver. Gastroenterology 114, 1046-1053
- Häussinger, D., Graf, D. and Weiergräber, O. H. (2001) Glutamine and cell signaling in liver.
 J Nutr 131, 2509-2514

- Häussinger, D. (1993) Control of protein turnover by the cellular hydratation state.
 Ital J Gastroenterol 25, 42-48
- Häussinger, D. (2004) Neural control of hepatic osmolytes and parenchymal cell hydration.
 Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 280, 893-900
- Häussinger, D., Stoll, B., vom Dahl, S., Theodoropoulos, P. A.,
 Markogiannakis, E., Gravanis, A., Lang, F. and Stournaras, C. (1994) Effect
 of hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels.
 Biochem Cell Biol 72, 12-19
- Häussinger, D., Reinehr, R. and Schliess, F. (2006) The hepatocyte integrin system and cell volume sensing.
 Acta Physiol (Oxf) 187, 249-255
- 129 Häussinger, D., Kurz, A. K., Wettstein, M., Graf, D., vom Dahl, S. and Schliess, F. (2003) Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. Gastroenterology 124, 1476-1487
- Schliess, F., Reissmann, R., Reinehr, R., vom Dahl, S. and Häussinger, D. (2004) Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver.
 J Biol Chem 279, 21294-21301
- Hohmann, S. (2002) Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system.
 Int Rev Cytol 215, 149-187
- 132 Maeda, T., Takekawa, M. and Saito, H. (1995) Activation of yeast *PBS*2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. **Science** 269, 554-558
- Heymann, D. (2006) Autophagy: A protective mechanism in response to stress and inflammation.
 Curr Opin Investig Drugs 7, 443-450
- Meijer, A. J. and Codogno, P. (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells.
 Int J Biochem Cell Biol 36, 2445-2462
- Häussinger, D., Stehle, T. and Lang, F. (1990) Volume regulation in liver: further characterization by inhibitors and ionic substitutions.
 Hepatology 11, 243-254

- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y. and Kominami, E. (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy.
 Mol Biol Cell 10, 1367-1379
- Mortimore, G. E. and Mondon, C. E. (1970) Inhibition by insulin of valine turnover in liver. Evidence for a general control of proteolysis.
 J Biol Chem 245, 2375-2383
- Mortimore, G. E. and Poso, A. R. (1987) Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply.
 Annu Rev Nutr 7, 539-564
- 139 vom Dahl, S. and Häussinger, D. (2004) Role of amino acids in the control of proteolysis.
 CRC Press, Boca Raton, 243-255
- 140 Wang, C. W. and Klionsky, D. J. (2003) The molecular mechanism of autophagy.
 Mol Med 9, 65-76
- 141 Chellappan, S. P. (2001) *HOG* on the promoter: regulation of the osmotic stress response.
 Sci STKE 2001, 1
- Powers, R. W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K. and Fields, S. (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling.
 Genes Dev 20, 174-184
- 143 Beck, T. and Hall, M. N. (1999) The *TOR* signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature** 402, 689-692
- Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation.
 J Biol Chem 280, 31582-31586
- Stromhaug, P. E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C. W. and Klionsky, D. J. (2004) Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy.
 Mol Biol Cell 15, 3553-3566
- Abeliovich, H., Zhang, C., Dunn, W. A., Jr., Shokat, K. M. and Klionsky, D. J. (2003) Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy.
 Mol Biol Cell 14, 477-490

- Abeliovich, H. and Klionsky, D. J. (2001) Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function.
 Microbiol Mol Biol Rev 65, 463-479
- 148 Suzuki, K., Kamada, Y. and Ohsumi, Y. (2002) Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. Dev Cell 3, 815-824
- Schliess, F., Richter, L., vom Dahl, S. and Häussinger, D. (2006) Cell hydration and *mTOR*-dependent signalling.
 Acta Physiol (Oxf) 187, 223-229
- 150 Kanazawa, T., Taneike, I., Akaishi, R., Yoshizawa, F., Furuya, N., Fujimura, S. and Kadowaki, M. (2004) Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to *mTOR* in isolated rat hepatocytes.
 J Biol Chem 279, 8452-8459
- 151 Weisman, R. (2004) The fission yeast *TOR* proteins and the rapamycin response: an unexpected tale.
 Curr Top Microbiol Immunol 279, 85-95
- 152 Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S. and Camougrand, N. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria.
 J Biol Chem 279, 39068-39074
- 153 Whittaker, C. A. and Hynes, R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere.
 Mol Biol Cell 13, 3369-3387

IX Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
API	Aminopeptidase I (proAPI: ungereift, mAPI: gereift)
APS	$(NH_4)_2S_2O_8$, Ammoniumpersulfat
Atg	"autophagy-related"
ATP	Adenosintriphosphat
AUT	"autophagy genes"
b p	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
с	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
(µ)Ci	(Mikro-) Curie
СМ	synthetisches Vollmedium
C-terminal	carboxyl-terminal
Cvt	"cytoplasm-to-vacuole targeting"
(k) D a	(Kilo-) Dalton
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DMSO	$C_2H_6O_5$, Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	Extinktion
E1-Enzym	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2-Enzym	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
ECL	"enhanced Chemoluminescence"
E. coli	Escherichia coli
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(diaminoethylenether)-N, N, N`, N`-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GFP	grün-fuoreszierendes Protein

Abkürzungsverzeichnis

	"high osmolarity glycerol"
HRP	"horseradish peroxidase", Meerrettich-Peroxidase
lgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaar
KAN	Kanamycin-Resistenzgen
K _m	Michaelis-Konstante
LB	Luria-Broth-Medium
LC	"light chain"
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LiSorb	Lithiumsorbitol
Lys	Lysin
MAPK	"mitogen activated protein kinase"
MG	Molekulargewicht
mPa	(milli-) Pascal
n	Anzahl der unabhängigen Experimente
n	Anzahl der unabhängigen Experimente
n OD ₆₀₀	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm
n OD ₆₀₀ ORF	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen
n OD ₆₀₀ ORF	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen
n OD ₆₀₀ ORF PAGE	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS p.A.	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis"
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS p.A. PCD	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death"
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PE	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin
n OD600 ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PE PEG	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin Polyethylenglycol
n OD600 ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PEG Pgk	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin Polyethylenglycol Phosphoglyceratkinase
n OD600 ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PEG PGS PMSF	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin Polyethylenglycol Phosphoglyceratkinase Phenylmethylsulfonylfluorid
n OD600 ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PEG PEG PMSF PVDF	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin Polyethylenglycol Phosphoglyceratkinase Phenylmethylsulfonylfluorid Polyvinylidenfluorid
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PEG PEG PMSF PVDF	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin Polyethylenglycol Phosphoglyceratkinase Phenylmethylsulfonylfluorid Polyvinylidenfluorid
n OD ₆₀₀ ORF PAGE PAS p.A. PCD PCR PEG PEG Pgk PMSF PVDF R NA RNASE	Anzahl der unabhängigen Experimente optische Dichte bei 600 nm "open reading frame", offener Leserahmen Polyacrylamid-Gelelektrophorese präautophagosomale Struktur "pro analysis" "programmed cell death" Polymerasekettenreaktion Phosphatidylethanolamin Polyethylenglycol Phosphoglyceratkinase Phenylmethylsulfonylfluorid Polyvinylidenfluorid
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
------------------	--
SD(-N)	N-freies Medium
SDS	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S, Natriumdodecylsulfat
SEM	"standard error of mean"
SFB	Sonderforschungsbereich
SLN	"synthetic Lethal of N-end rule"
TAE	TRIS / Acetat mit EDTA
TBS	"TRIS buffered saline"
TBST	"TRIS buffered saline with Tween 20"
TCA	C ₂ Cl ₃ O ₂ H, Trichloressigsäure
TE	TRIS mit EDTA
TEMED	N, N, N`, N`, -Tetramethylethylendiamin
TOR	"target of rapamycin"
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Ub	Ubiquitin /Ubiquitin-Rest
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UV	ultraviolette Strahlung
% (v /v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
VV I	ννιιατγρ
YNB	"yeast nitrogen base"
YPD	"yeast extract, peptone, dextrose", Glucose-Vollmedium

X Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. Häussinger danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut für "Experimentelle Hepatologie" und damit die Möglichkeit, diese Dissertation anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. S. vom Dahl für die Überlassung eines äußerst interessanten Themas. Besonders bedanke ich mich für seine Unterstützung und die unzähligen Diskussionen und Anregungen in den vergangenen Jahren.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Ernst danke ich für die Betreuung meiner Promotion als Gutachter in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ein herzlicher Dank an Prof. Dr. rer. nat. M. Thumm für die wissenschaftliche Unterstützung und die Einarbeitung in die "Autophagie-Methodik" am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Köhrer danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und seine Hilfsbereitschaft.

Bei Frau N. Eichhorst und Frau C. Holneicher bedanke ich mich besonders für die Bereitschaft, sich meine wissenschaftlichen Probleme anzuhören und mir mit wertvollen Ratschlägen weiterzuhelfen. Ein besonderer Dank gilt Frau N. Eichhorst, die zahlreiche Stunden auf die Durchsicht dieser Arbeit verwandt hat.

Allen Institutsmitgliedern der "Experimentellen Hepatologie" danke ich für das äußerst freundliche Arbeitsklima, gegenseitige Hilfestellung und die vergnügliche Zeit außerhalb des Labors.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund J. Wright für seine zuverlässige Unterstützung und das Lösen der vielen kleinen und großen Probleme mit dem Computer.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich auch während der Promotion fortwährend unterstützt haben.

XI Lebenslauf

Name:	Tanja Prick
Geburtstag:	24. Oktober 1975
Geburtsort:	Viersen
Eltern:	Maria Elisabeth Prick, geb. Inderdühnen
	Heinz-Jürgen Prick
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1982 - 1986	Besuch der Katholischen Grundschule in Bracht
1986 - 1995	Besuch des Albertus-Magnus-Gymnasiums in Dülken
Juni 1995	Schulabschluss mit Abitur

Studium

1995 - 2001Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität in
Düsseldorf

Oktober 2000 Diplomprüfung Biologie

2000 - 2001 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. rer. nat. C. Hollenberg, Arbeitsgruppe: Dr. rer. nat. V. Stoldt über das Thema "Kontrolle der mRNA-Stabilität durch AU-reiche Elemente in Thrombozyten, deren Vorläuferzellen und Saccharomyces cerevisiae"

- seit 2001 Promotion am Institut für Experimentelle Hepatologie der Klinik für Hepatologie, Gastroenterologie und Infektiologie Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. med. D. Häussinger, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. med. S. vom Dahl über das Thema: "Osmosensitivität der Autophagie in der Hefe Saccharomyces cerevisiae – Parallelen und Unterschiede zur Säugerleber"
- 2001 Forschungsaufenthalt (6 Monate) am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart, Direktor: Prof. Dr. rer. nat. D. H. Wolf, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. rer. nat. M. Thumm

Berufliche Tätigkeit

- Studentische Hilfskraft in der Klinik für Allgemeine
 Pädiatrie, Neurologie und Pneumologie Düsseldorf,
 Direktor: Prof. Dr. med. H.-G. Lenard, Arbeitsgruppe: Prof.
 Dr. med. J. Gärtner
- seit August 2004 Mitbetreuung einer medizinischen Doktorarbeit am Institut für Experimentelle Hepatologie der Klinik für Hepatologie, Gastroenterologie und Infektiologie Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. med. D. Häussinger, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. med. S. vom Dahl über das Thema: "Die Rolle von *PBS2* bei der Osmoregulation der Autophagie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*"

Düsseldorf, 05.10.200

Eidestattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 05.10.2006

Tanja Prick