

Regulation der Mitophagie in *Saccharomyces cerevisiae* durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung

Dissertation

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

vorgelegt von

Christina Behrendt

aus Mainz

Düsseldorf, März 2017

aus dem Institut für **Biochemie und Molekularbiologie I**,
der Heinrich- Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Andreas Reichert
Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2017

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	5
1.1 Mitochondrien.....	5
1.1.1 Architektur der Mitochondrien.....	6
1.1.2 Mitochondriale Dynamik.....	7
1.2 Autophagie.....	10
1.2.1 Der molekulare Mechanismus der Autophagie.....	12
1.2.2 Selektive Autophagie.....	15
1.3 Mitophagie.....	19
1.3.1 Mitophagie in Säugerzellen.....	21
1.3.2 Mitophagie in Hefe.....	24
1.4 Ubiquitin.....	27
1.4.1 Ubiquitin kodierende Gene in Hefe.....	29
1.5 Zielsetzung.....	31
2 Methoden und Material	33
2.1 Chemikalienliste.....	33
2.2 Geräteliste.....	34
2.3 Kulturmedien.....	36
2.4 Stämme.....	37
2.5 Primer.....	42
2.6 Plasmide.....	43
2.7 Antikörper.....	44
2.8 Methoden in der Hefegenetik.....	45
2.8.1 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	45
2.8.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit DNA.....	45
2.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	46
2.8.4 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> für PCR-basierende Applikation.....	47
2.8.5 Gendeletion in <i>S. cerevisiae</i>	47
2.9 Biochemische Methoden.....	48
2.9.1 ALP Assay zur quantitativen Bestimmung der Mitophagie-bzw. Autophagieaktivität.....	48
2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
2.9.3 Western Blot.....	51
2.9.4 Immunologische Detektion von Proteinen.....	51

2.9.5 HA-Immunopräzipitation für die Analyse der Ubiquitinierung von Fzo1.....	51
2.10 Molekularbiologische Methoden.....	52
2.10.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	52
2.10.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	53
2.10.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	53
2.10.4 Restriktionsverdau von DNA.....	54
2.10.5 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	54
2.10.6 Transformation of <i>E. coli</i> with DNA.....	54
2.10.7 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	55
2.10.8 DNA Sequenzierung.....	55
2.10.9 Klonierungsstrategie.....	55
2.11 Zelluläre Fraktionierung.....	56
2.11.1 Isolation von Mitochondrien.....	56
2.11.2 Isolation von Mitochondrien durch Gradientenzentrifugation.....	57
2.12 Fluoreszenzmikroskopie.....	58
3 Ergebnisse.....	60
3.1 Charakterisierung des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes.....	60
3.1.1 Die katalytische Aktivität der Deubiquitinase Ubp3 ist essentiell für die Wirkung auf Mito- und Autophagie.....	60
3.1.2 Beeinträchtigung des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes resultiert in einer verstärkten Mitophagie.....	62
3.1.3 Ubp3 und Bre5 sind an den Mitochondrien lokalisiert.....	63
3.1.4 Der Einfluss des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes auf die Mitophagie ist Atg32-abhängig.....	68
3.2 Einfluss der nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene auf verschiedene Formen der Autophagie.....	69
3.2.1 Ubi4 ist erforderlich für die Mitophagie in <i>S. cerevisiae</i>	69
3.2.2 Einfluss der drei nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene auf andere Formen der selektiven Autophagie.....	74
3.2.3 Ubi4 ist generell für die Mitophagie erforderlich.....	76
3.2.4 Die Verknüpfung von Ubiquitin via K48 ist für die Mitophagie erforderlich.....	79
3.2.5 Ubp3-bedingte Regulation der Mitophagie ist Ubi4-abhängig.....	81
3.2.6 Interaktion zwischen Ubi4 und der Rezeptor-vermittelten Mitophagie.....	82
3.2.7 Ubiquitinierung von Mitochondrien ändert sich dynamisch nach Rapamycin-induzierter Mitophagie.....	84
3.2.8 Ubi4 Vorläufer transloziert zu den Mitochondrien.....	86
3.3 Die Abhängigkeit der Mitophagie vom mitochondrialen Außenmembranprotein Fzo1.....	89
3.3.1 Ubiquitinierung von Fzo1 ist relevant für die Mitophagie.....	89

3.3.2 Ubiquitinierung von Fzo1 an Lysin 464 fördert die Mitophagie.....	92
3.3.3 Mitophagie ist unabhängig von der mitochondrialen Außenmembranfusion	96
3.3.4 Ubiquitinierungsstatus von Fzo1.....	97
4 Diskussion	100
4.1 Regulation der Mitophagie durch den Ubp3/Bre5 Deubiquitinase-Komplex.....	101
4.2 Gen-spezifischer Effekt auf verschiedene Formen der Autophagie in Abhängigkeit vom Ubiquitin- kodierenden Gen.....	106
4.2.1 UBI1 und UBI2 beeinflussen spezifisch die 60S Ribophagie.....	107
4.2.2 Die Rolle von <i>UBI4</i> für die Induktion der Mitophagie	108
4.3 Fzo1 ist ein Substrat für den Ubiquitin-vermittelten Weg der Mitophagie.....	111
5 Zusammenfassung	116
6 Summary.....	119
7 Literaturverzeichnis	122
8 Abkürzungsverzeichnis	138
9 Danksagung	141

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind eukaryotische Zellorganellen, in denen wichtige biochemische Reaktionen des Energiestoffwechsels wie der Citratzyklus und die Atmungskette und die damit verbundene Synthese von ATP, lokalisiert sind (Mitchell, 1961). Daher werden diese Organellen auch die „Kraftwerke“ der Zelle genannt. Neben der Bereitstellung von Energie sind Mitochondrien an weiteren zahlreichen, zellulären Prozessen beteiligt, u.a. an der Bildung von Eisen-Schwefel-Zentren, dem Abbau von Fettsäuren, der Synthese von Aminosäuren, der Hämoglobinsynthese und der Apoptose (Gottlieb, 2001; Lill & Kispal, 2000).

Entsprechend der endosymbiotischen Theorie entstanden Mitochondrien dadurch, dass ein Eubakterium von einer eukaryotischen Vorläuferzelle aufgenommen wurde (Gray et al, 1999; Lang et al, 1999; Margulis, 1971). Daher verfügen Mitochondrien über ein eigenes Genom (mitochondriale DNA) und eine eigenständige Proteinsynthese-Maschinerie, welche in der mitochondrialen Matrix lokalisiert sind (Clark & Marcker, 1966). Nur etwa 1% von insgesamt 1000-1200 mitochondrialen Proteinen wird von der mitochondrialen DNA synthetisiert (Osiewacz & Bernhardt, 2013). Der Großteil der Proteine wird im Cytoplasma von der nuklearen DNA synthetisiert und anschließend in das Organell transportiert. Die mitochondriale DNA (mtDNA) des Menschen setzt sich aus 16.569 bp (Basenpaaren) zusammen und bildet einen zirkulären Doppelstrang. Das Molekül kodiert für 37 Proteine: 13 Protein-Untereinheiten der oxidativen Phosphorylierung, 12S und 16S rRNA, sowie 22 tRNAs für die Synthese mitochondrialer Proteine (Wallace, 1999; Wolstenholme, 1992). Eine Zelle kann 100-10000 Kopien an mtDNA und 10-15 pro Mitochondrium besitzen. Sind alle Kopien des mitochondrialen Genoms in einer Zelle identisch, so spricht man von Homoplasmie. Liegen unterschiedliche Kopien der mtDNA im Mitochondrium vor, liegt eine Heteroplasmie vor (Taylor & Turnbull, 2005). Mitochondrien entstehen nicht *de novo*, sondern können nur aus bestehenden Mitochondrien durch Wachstum und Teilung (Kapitel 1.1.2) hervorgehen. In Tieren erfolgt die mitochondriale Vererbung maternal, d.h. diese Zellorganellen werden von der Mutter an die Nachkommen weitergegeben. Die väterliche mtDNA wird unmittelbar nach der Befruchtung abgebaut (Al Rawi et al, 2011; Sato & Sato, 2011).

1.1.1 Architektur der Mitochondrien

Mitochondrien bilden ein miteinander verbundenes tubuläres Netzwerk, dessen Morphologie durch Teilungs- und Fusionsprozessen bestimmt ist, sowie durch den metabolischen Status der Organelle. Strukturell ist das Mitochondrium umgeben von einer Doppelmembran, die getrennt durch den Intermembranraum sich aus einer Innen- und Außenmembran zusammensetzt (Abb. 1). Die Außenmembran (engl. ‚*outer membrane*‘) repräsentiert eine Barriere zum Zytosol. Durch porenförmige Transmembranproteine, Porine, wird eine Diffusion von Ionen und kleinen Proteinen (< 6000 Dalton) gewährleistet (Nikaido & Rosenberg, 1981; Nikaido et al, 1976). Größere Proteine können die Membran mittels Translokasen, z.B. TOM-Komplex, passieren (Sokol et al, 2014). An der Schnittstelle zwischen der äußeren mitochondrialen Membran und dem Endoplasmatischem Retikulum (ER) wurde eine membranöse Struktur identifiziert, die Mitochondrien-assoziierte ER-Membran (MAM) (Hayashi et al, 2009). Diese Struktur stellt eine Verbindung zwischen dem ER und den Mitochondrien dar und ist in zahlreichen metabolischen Prozessen, u.a. Calcium-Homöostase oder Transport von Phospholipiden zwischen ER und Mitochondrien involviert (Csordas et al, 2010; Vance, 2003).

Morphologisch kann die Innenmembran in mehrere Subkompartimente gegliedert werden: innere Grenzmembran (engl. ‚*inner boundary membrane*‘) und Cristamembran. Die Grenzmembran schließt an die Außenmembran an (siehe Abb.1). Zwischen diesen Membranen liegt der Intermembranraum. Die Cristamembran umfasst die Einstülpungen (Cristae) in den Innenraum des Organells (Matrix). Die Struktur der Cristamembran variiert je nach Zelltyp, Gewebe und Energielevel der Zelle und reicht von tubulär über lamellar bis zu dreiecksförmig (Zick et al, 2009). Verbunden wird die Cristamembran mit der Grenzmembran durch tubuläre Öffnungen den CJ (engl. ‚*Crista junctions*‘), und formen den Intracristaraum (Frey & Mannella, 2000; Frey et al, 2002; Mannella et al, 1994).

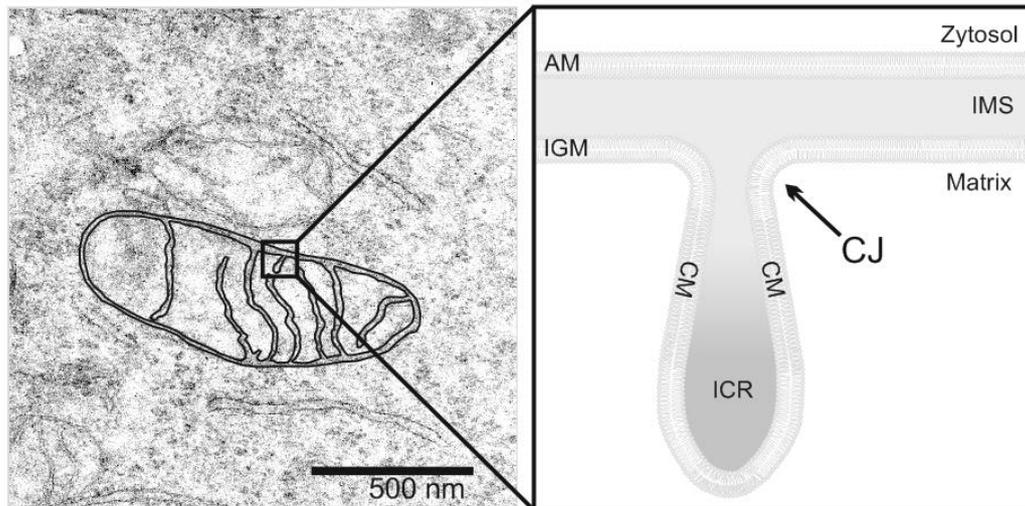


Abbildung 1: Die mitochondriale Architektur (adaptiert nach Koob & Reichert, 2014). Abgebildet ist die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums (links) und der schematische Aufbau der mitochondrialen Doppelmembran (rechts). AM: Außenmembran, IMS: Intermembranraum, IGM: innere Grenzmembran, CM: Cristamembran, ICR: Intracristarum, CJ: Crista junction. (Koob & Reichert, 2014)

1.1.2 Mitochondriale Dynamik

Oft werden Mitochondrien als starre isolierte Organellen dargestellt. Neuere Studien demonstrieren, dass Mitochondrien ein dynamisches tubuläres Netzwerk bilden (Kuznetsov et al, 2009). Die Aufrechterhaltung dieses Netzwerks wird durch ein Gleichgewicht zur mitochondrialen Teilung (engl. ‚fission‘) und Fusion, der sogenannten mitochondrialen Dynamik, gewährleistet (Nunnari et al, 1997). Die zentralen molekularen Komponenten in diesen Prozessen gehören zur Proteinfamilie der Dynamine (Abb.2).

Die Fusion der mitochondrialen Außenmembran ist abhängig von den Mitofusinen (Mfn1 bzw. Mfn2) in Säugern und von Fzo1 in Hefe (Rojo et al, 2002). Ebenfalls benötigt dieser Mechanismus in Hefe noch die Proteine Ugo1 und Mdm30 (Anton et al, 2011). Die Innenmembranfusion wird durch Opa1 (Mgm1 in Hefe) kontrolliert (Davies & Votruba, 2006). Der antagonistische Gegenspieler in der mitochondrialen Teilung ist Drp1 (Dnm1 in Hefe). Die koordinierte Regulation der Fusion der Innen- und Außenmembran erfordert zwei separate Maschinerien. Die Außenmembranfusion wird durch den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau des mitochondrialen Proteins Mitofusin bzw. Fzo1 reguliert (Anton et al, 2013). Die Fusion der inneren Membran wird durch Beeinflussung der enzymatischen Spaltung von OPA1 (Mgm1) kontrolliert. OPA1 bzw. Mgm1 existiert in zwei Formen: s-OPA1 (s-Mgm1) und l-OPA1 (l-Mgm1). Die lösliche kurze s-Form entsteht durch proteolytische

Spaltung aus der langen I-Form. Typischer Weise liegen beide Versionen circa 1:1 in der Zelle vor und sind für die Fusion essentiell.

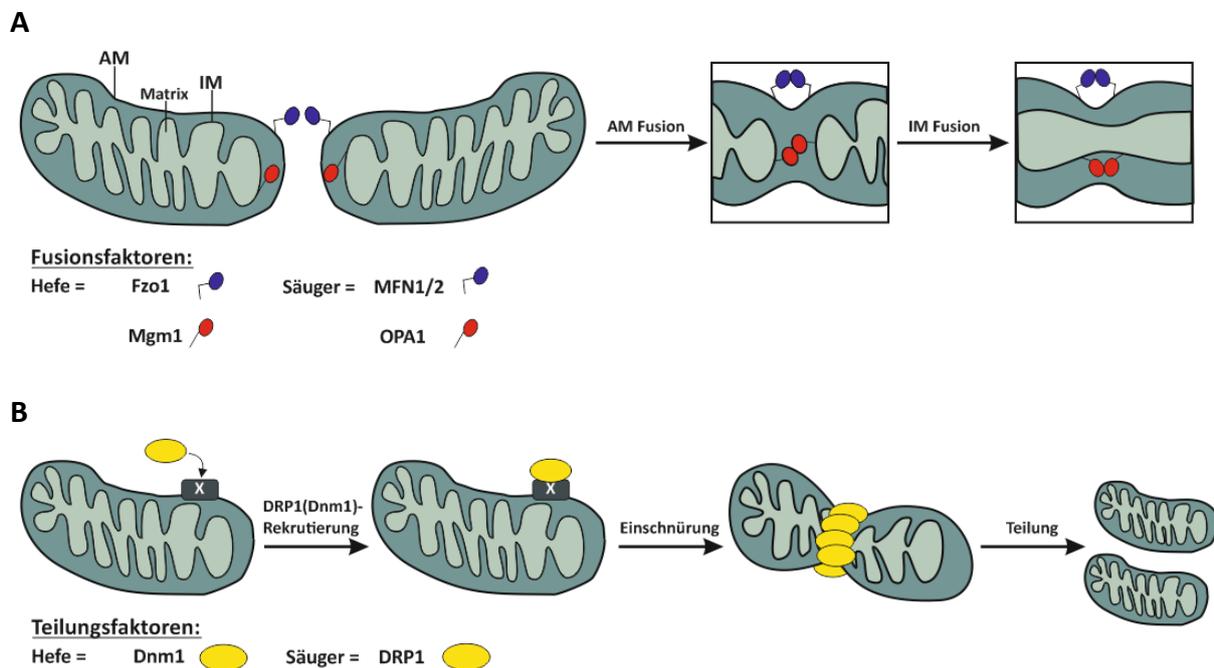


Abbildung 2: Schematische Darstellung der mitochondrialen Fusion und Teilung. **A:** Darstellung der mitochondrialen Fusion in Säugetierzellen. Die Fusionsfaktoren MFN1/2 bzw. Fzo1 (in Hefe) leiten die Fusion der Außenmembran (AM) ein. Während für die Fusion der inneren mitochondrialen Membran (IM) OPA1 bzw. Mgm1 (in Hefe) essentiell ist. **B:** Die Teilung (Fission) erfordert die Rekrutierung von Drp1 (Dnm1 in Hefe). Das Protein kann durch verschiedene mitochondriale Faktoren (X = Fis1, MEF, MID49, MIDS1) zum Organell rekrutiert werden.

Die mitochondriale Teilung wird durch eine große Bandbreite an posttranslationalen Proteinmodifikationen, z.B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung oder Nitrosylierung, reguliert. So können unterschiedliche Kinasen Drp1 an drei verschiedenen Stellen phosphorylieren und damit die Teilungsrate kontrollieren. Die Phosphorylierung an Serin-616 durch u.a. Proteinkinase C führt zur Aktivierung der Teilung. Während die Phosphorylierung von Drp1 an Serin-637 die Hemmung der Fission bewirkt (Chang & Blackstone, 2007). Modifikation des Serins an Position 693 inhibiert die mitochondriale Teilung während der Apoptose (Chou et al, 2012). Eine Verlagerung zu übermäßiger Teilung, zum Beispiel durch Mutation von Mfn1/2, führt zur Fragmentierung des Netzwerkes. Das Blockieren der Teilung führt zu großen miteinander verbundenen Mitochondriennetzwerken.

1.1.3 Mitochondriale Dysfunktion und Qualitätskontrolle

Mitochondrien sind in zahlreichen zellulären Prozessen involviert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass mitochondriale Dysfunktion mit zahlreichen neurologischen und muskulären Erkrankungen assoziiert ist. Bei der oxidativen Phosphorylierung entstehen als Nebenprodukte radikale Sauerstoffspezies (ROS), die als wichtige Signalstoffe fungieren, aber auch die mtDNA, Lipide und Proteine schädigen können. Überproduktion von ROS und damit oxidativer Stress kann zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials und zum Zelltod durch Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum führen (Desagher & Martinou, 2000; Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003; Wang, 2001). Beispielsweise werden Cytochrom c und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma ausgeschüttet und vermitteln die Apoptose (Garrido et al, 2006; Susin et al, 1999).

Mitochondriale Störungen im Menschen können auf Mutationen in der mitochondrialen und/oder nuklearen DNA zurückzuführen sein (Taylor & Turnbull, 2005). Anfällig sind besonders langlebige postmitotische Zellen wie z.B. Neuronen. Diese eukaryotischen Zellen teilen sich nach der Differenzierung nicht mehr und sind daher anfällig für schädliche Folgen pathogener Mutationen. Dies ist einer der Gründe, warum mehrere neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. die Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington oder Alzheimer, mit einer mitochondrialen Dysfunktion verbunden sind (Jin & Johnson, 2010; Schäfer & Reichert, 2009). Einige dieser Neuropathien sind mit Mutationen in Genen assoziiert, die für Proteine kodieren, die für die mitochondriale Dynamik notwendig sind. Beispielsweise führt die Mutation im Gen *OPA1* zur autosomal dominant vererbten Optikusatrophie Typ 1 Erkrankung (Alexander et al, 2000; Delettre et al, 2000). Diese Neuropathie beeinflusst die retinalen Ganglienzellen des Sehnervs. Mitochondriale Schäden und Akkumulationen an mtDNA-Mutationen stehen in Verbindung mit der eukaryotischen Zellalterung. Des Weiteren wurde die mitochondriale Dysfunktion auch mit verzögerter Gehirnentwicklung, Krebs, Diabetes und Adipositas (Fettleibigkeit) assoziiert (Gerbitz et al, 1996; Ross et al, 2013).

Zur Beschränkung bzw. Vermeidung mitochondrialer Schäden hat die Zelle zahlreiche Qualitätskontrollmechanismen entwickelt (Ni et al, 2015). Für die Proteinqualitätskontrolle existieren im Mitochondrium verschiedene Enzyme, u.a. spielen molekulare Chaperone und ATP-abhängige Proteasen eine zentrale Rolle. Diese Enzyme überwachen die Qualität

mitochondrialer Proteine und entfernen selektiv überschüssige, fehlgefaltete oder beschädigte Proteine aus dem Mitochondrium. Beispielweise sind die in der Matrix lokalisierten Proteasen ClpXP und Lon1/Pim1 verantwortlich für den Abbau von löslichen Proteinen (Kotiadis et al, 2014; Truscott et al, 2011; Venkatesh et al, 2012).

Erreicht die molekulare Qualitätskontrolle ihr Limit und nimmt die mitochondriale Schädigung weiter zu, dann übernimmt im nächsten Schritt auf Organellenebene, die mitochondriale Teilung und Fusion, die Qualitätskontrolle (Osiewacz & Bernhardt, 2013). Kontinuierliche Teilungs- und Fusionsprozesse sorgen für eine Vermischung von mitochondrialen Inhalten und ermöglichen die Komplementierung von geschädigten Proteinen und mtDNA-Molekülen (Ono et al, 2001). Darüber hinaus kann durch die mitochondriale Fission spezifisch dysfunktionelle Mitochondrien aus dem integralen Netzwerk in Säugern entfernt werden (Twig et al, 2008a). Ganze Mitochondrien können selektiv durch einen autophagischen Prozess, Mitophagie, abgebaut werden (Kapitel 1.3). Die Mitophagie scheint mit der mitochondrialen Dynamik verknüpft zu sein. Studien in Säugerzellen zeigen, dass durch die Fission ein dysfunktionales Mitochondrium, das ein reduziertes Membranpotential aufweist, unfähig ist mit dem Mitochondriennetzwerk zu fusionieren und durch die Mitophagie abgebaut wird (Dagda et al, 2009; Twig et al, 2008b). In Hefe ist die Mitophagie unabhängig von der mitochondrialen Teilung (Mendl et al, 2011).

Erfolgt der Abbau von geschädigten Mitochondrien ineffizient, wird auf zellulärer Ebene die Apoptose, der programmierte Zelltod, durch die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen (Cytochrom c) aus dem Intermembranraum als endgültiges Mittel zur Qualitätskontrolle induziert (Maiuri et al, 2007).

1.2 Autophagie

Autophagie ist ein zellulärer Prozess, bei dem zytosolische Proteine, Organellen oder invasive Pathogene abgebaut werden. Dieser intrazelluläre Abbau ist in allen eukaryotischen Zellen konserviert. Die Initiation erfolgt als Antwort u.a. auf zellulären Stress, Infektionen, oxidativer Stress oder Nahrungsmangel. Im Zuge dessen bildet sich das Phagophor (isolierende Membran) im Zytosol, expandiert und bildet schließlich das Autophagosom, das die

zytosolischen Komponenten enthält. Durch Fusion mit der Vakuole bzw. dem Lysosom und den darin enthaltenen Enzymen wird der Autophagosomeninhalt abgebaut.

Drei morphologische Formen der Autophagie lassen sich differenzieren: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (Cuervo, 2004; Mizushima, 2005). Durch Induktion der Makroautophagie bildet sich eine doppelmembranförmige Struktur aus, die Proteine und Organellen umschließt (Autophagosom). Das Autophagosom fusioniert mit dem/der Lysosom/Vakuole und der Inhalt wird durch Hydrolasen abgebaut (siehe Abb.3). Bei der Mikroautophagie wird zytosolisches Material direkt vom Lysosom/Vakuole aufgenommen und abgebaut. Beide Typen der Autophagie wurden in Säugern und Hefe beobachtet.

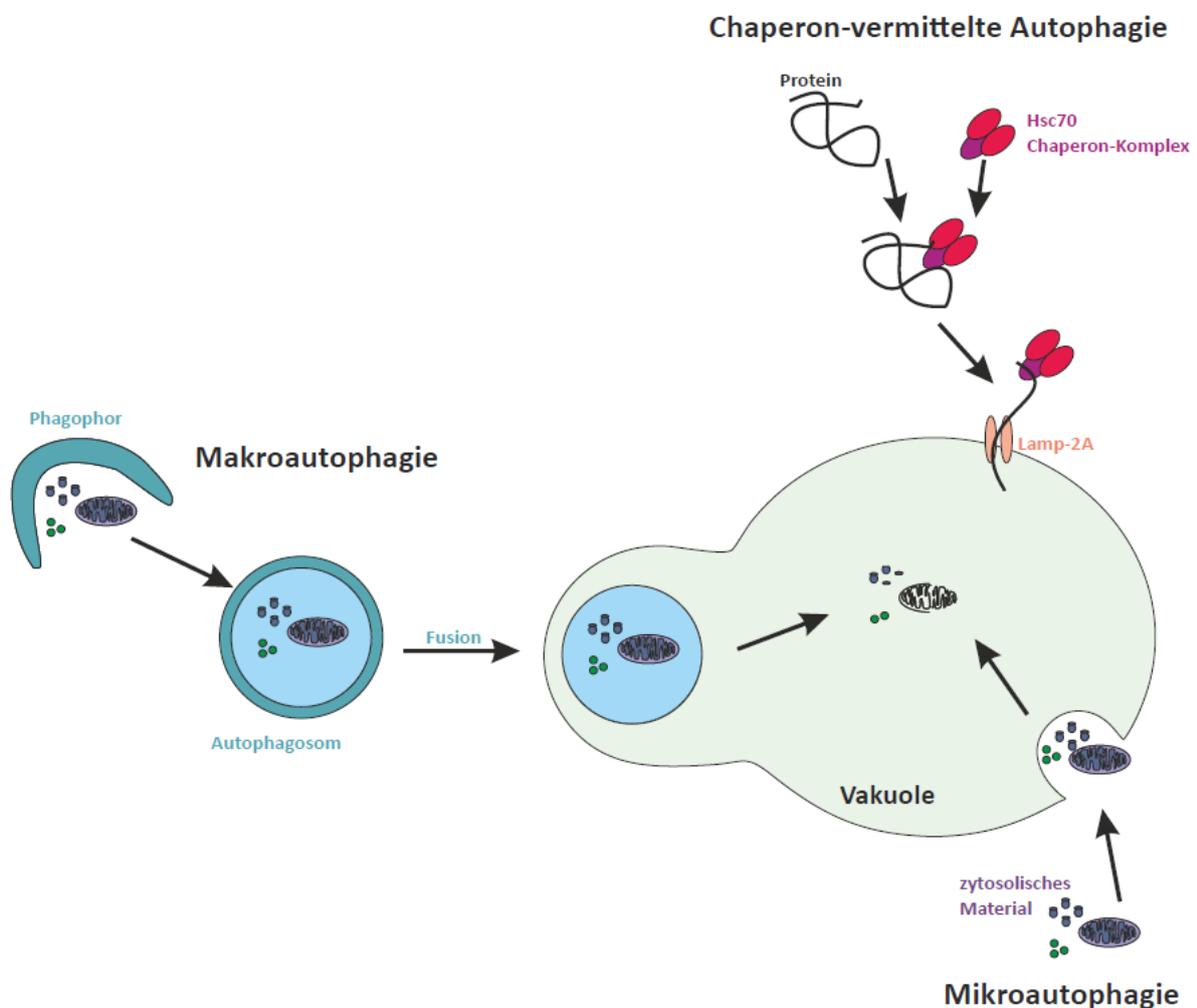


Abbildung 3: Drei Formen der Autophagie. Dargestellt sind die drei morphologischen Formen der Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie. Bei der Makroautophagie bildet sich die isolierende Membran (Phagophor) aus, diese expandiert und umschließt durch Bildung des Autophagosoms zytosolische Komponenten. Dann fusioniert das Autophagosom mit dem Lysosom/Vakuole. In der Mikroautophagie wird durch eine unmittelbare Membranzustrukturierung der Lysosomen/Vakuolen zelleigenes Material umschlossen und dann abgebaut. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden Substrate mit Hilfe von Hsc70 und Co-Chaperonen durch die Membran der Lysosomen/Vakuole transportiert.

Im Gegensatz dazu werden bei der Chaperon-vermittelten Autophagie durch den Hsc70/Co-Chaperon Komplex spezifische Proteine durch das lysosomale Protein Lamp-2A in das lysosomale Lumen transloziert. Dieser Mechanismus wurde bislang nur in höheren eukaryotischen Organismen detektiert.

Des Weiteren unterscheidet man zwischen selektiver und nicht-selektiver Autophagie. Erstere zeichnet sich durch die spezifische Sequestrierung von bestimmten Proteinen oder Organellen aus. Durch eine Vielzahl an Studien, besonders in *Saccharomyces cerevisiae*, sind bislang mehr als 40 Atg-Gene (engl. ‚*autophagy-related*‘), deren Produkte an der selektiven und nicht-selektiven Autophagie beteiligt sind, identifiziert worden. Die Mehrheit dieser Gene sind für alle Formen der Autophagie wichtig. Einige sind nur für spezifische autophagische Prozesse verantwortlich.

1.2.1 Der molekulare Mechanismus der Autophagie

Der autophagische Prozess beinhaltet mehrere Schritte von der Induktion, zur Bildung des Autophagosom bis hin zum Abbau des umschlossenen Materials. Diese Maschinerie benötigt zahlreiche Autophagie-assoziierte (Atg) Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit wird im Folgenden der molekulare Ablauf der Autophagie in Hefe näher erläutert.

Induktion der Autophagie

Der Hauptregulator der Autophagie ist die Serin/Threonin Proteinkinase TOR (engl. ‚*target of rapamycin*‘). Normale Wachstumsbedingungen führen zur Hemmung der Autophagie durch die aktive TOR Kinase. Unter nährstoffarmen Verhältnissen oder Rapamycin-Behandlung wird die Autophagie durch Inhibierung der TOR Kinase induziert (Heitman et al, 1991). In der Hefe existieren zwei TOR Kinasen, Tor1 und Tor2, die mit weiteren Komponenten zwei TOR-Komplexe, TORC1 und TORC2, formen. Nur TORC1 wird vom Antibiotikum Rapamycin inaktiviert. Unter nährstoffreichen Konditionen vermittelt TORC1 eine Hyperphosphorylierung von Atg13. Das hyperphosphorylierte Atg13 kann Atg1 nicht binden, so dass Atg1 Atg11 rekrutiert und dadurch den Cvt-Weg induziert (Abb. 4, Cvt-Weg). Bei Nährstoffmangel bzw. Rapamycin-Behandlung wird Atg13 dephosphoryliert, was zu einer erhöhten Affinität zu Atg1 und zur Bildung des Atg1-Atg13-Atg17-Komplexes führt (Kawamata et al, 2008; Suzuki et al, 2007). Weitere Autophagie-assoziierte Proteine werden zur PAS (engl.

‚phagophore assembly site‘), eine spezifische Stelle nahe der Vakuole, rekrutiert um die Bildung des Autophagosoms zu initiieren (Suzuki et al, 2001). Kawamata *et al.*, zeigten darüber hinaus, dass Atg17 mit zwei weiteren Atg Proteinen interagiert: Atg29 und Atg31 (Kawamata et al, 2008). Diese Autophagie-assoziierten Proteine bilden einen Gerüst-Komplex (engl. ‚scaffold complex‘), der für die Bildung der PAS essentiell ist (Fujioka et al, 2014).

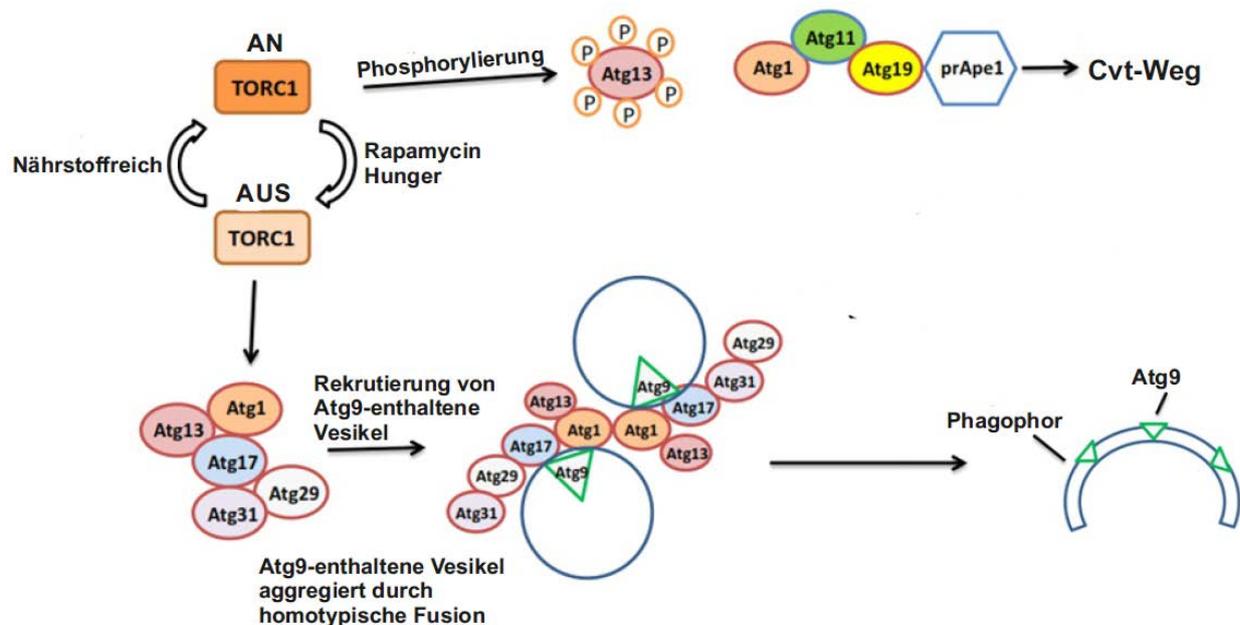


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Autophagie-Induktion bzw. Cvt-Weg (teilweise adaptiert nach Yang *et al.*, 2014). Unter nährstoffreichen Konditionen blockiert TORC1 die Autophagie, sodass kein Gerüst-Komplex (Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31-Komplex) entsteht. TORC1 wird durch Rapamycin-Behandlung oder bei Nährstoffmangel inaktiviert und die Autophagie dadurch induziert (Yang & Rosenwald, 2014).

Phagophor-Bildung

Bei der Initiation der Autophagie durch Bildung des Atg1-Atg13-Atg17 Komplexes werden weitere Atg Proteine rekrutiert. Diese müssen stark reguliert und koordiniert werden, um die isolierende Membran, das Phagophor, zu bilden. Die Keimbildung und das Zusammenlagern der isolierenden Membran erfordert den Phosphatidylinositol 3-Kinasekomplex (PtdIns3-Komplex), besteht aus Vps34, Vps15, Atg14 und Atg6. Der PtdIns3-Komplex synthetisiert Phosphatidylinositol-3-Phosphat, um weitere Atg Proteine zur Autophagosom-Bildung zu werben (Obara & Ohsumi, 2008). Die Herkunft der Membran, die für die Ausbildung des Autophagosoms benötigt wird, ist noch unklar. Organellen wie das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat oder die Mitochondrien könnten der Ursprung der autophagosomalen Membran sein (Juhász & Neufeld, 2006; Reggiori et al, 2005). Jüngste

Ergebnisse einer Studie zeigen, dass die Phosphorylierung des Membranproteins Atg9 an der Ausbildung des Autophagosoms involviert ist (Feng et al, 2016). Die Lokalisierung von Atg9 wechselt dynamisch zwischen der PAS und den Mitochondrien, so dass Atg9 als Membran-Shuttel angesehen wird, das Lipide zum expandierenden Phagophor transportiert.

Elongation und Vervollständigung des Autophagosoms

Der PtdIns3K-Komplex rekrutiert zusammen mit bestimmten Atg Proteinen zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme, das Atg8-Phosphatidylethanolamin (Atg8-PE) und den Atg12-Atg5-Atg16-Komplex. Diese zwei Konjugationssysteme sind wichtig für die Regulation der prä-autophagosomalen Membranelongation und die Vollendung des Autophagosoms (Ichimura et al, 2000; Mizushima et al, 1998). Die Cysteinprotease Atg4 setzt am C-terminalen Ende von Atg8 ein Arginin frei, sodass ein Glycin-Rest am Atg8 mit dem Cystein-Rest von Atg7 interagiert (Abb.5).

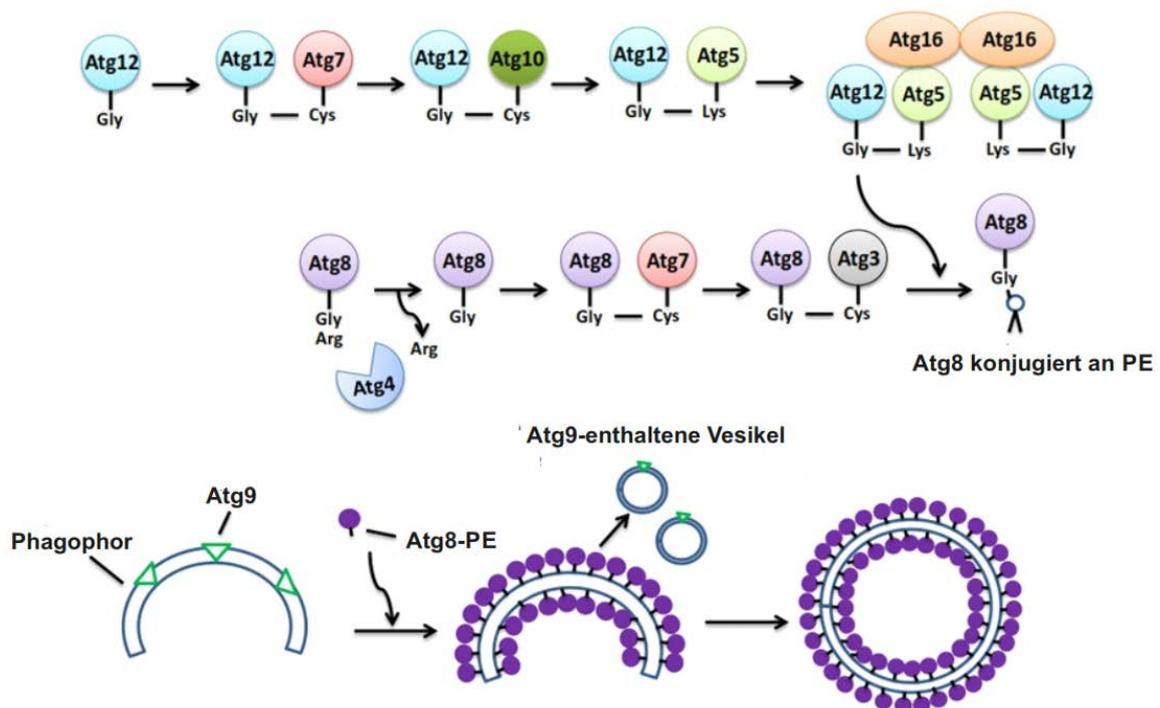


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Atg8-PE Herstellung und Autophagosom Elongation (teilweise adaptiert nach Yang et al., 2014). Dargestellt ist die Spaltung des Atg8 und nachfolgender Verknüpfung des PE mit dem Atg8 durch mitwirken des Atg12-Atg5-Atg16-Komplexes. Das Atg8-PE wird mit dem Phagophor verbunden und wirkt an der Autophagosomen-Vollendung mit (Yang & Rosenwald, 2014).

Atg7 vermittelt die Reaktion zwischen Atg8 und Atg3. Zusammen mit dem Atg5-Atg12-Atg16-Komplex wird PE auf Atg8 transferiert. Die Umwandlung von Atg8 zu Atg8-PE ist mit der

Anheftung an den Phagophor verbunden. Im weiteren Verlauf ist Atg8 an der Ausdehnung und Vollendung des Autophagosoms beteiligt.

Fusion mit der Vakuole und Cargo-Abbau

Nach Abschluss der Autophagosomen-Bildung wird Atg8 vom Phosphatidylethanolamin durch Atg4 freigesetzt. Auch die anderen Atg Proteine dissoziieren vom Autophagosom. Der molekulare Mechanismus dahinter ist jedoch noch unerforscht. Die Fusion zwischen dem finalen Vesikel und der Vakuole erfolgt mit der gleichen Maschinerie, die an homotypischen vakuolären Membranfusionen beteiligt ist. Dieser Apparat beinhaltet die GTPase Ypt7, Sec18, die SNARE (engl. ‚*N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*‘) Proteine Vam3, Vam7, Vti1 und Ytkk6, sowie den Vps/HOPS-Komplex, Ccz1 und Mon1 (Wang & Klionsky, 2003). Nach der Fusion der äußeren autophagosomalen Membran mit der Vakuole wird die innere Membran, autophagosomischer Körper (engl. ‚*autophagic body*‘), samt Inhalt in das vakuoläre Lumen entlassen. Der Abbau erfolgt über vakuoläre Hydrolasen und Atg15 (Yang & Klionsky, 2009). Der letzte Schritt des Recyclings ist der Transport der entstandenen Moleküle zurück ins Zytosol durch etliche Permeasen, u.a. Atg22, Avt3 und Avt4 (Yang et al, 2006).

1.2.2 Selektive Autophagie

Charakteristisch für diese Art der Autophagie ist, dass selektiv spezifische Fracht (engl. ‚*cargo*‘), wie Proteinaggregate, Pathogene, Enzyme oder ganze Organellen, gezielt in Autophagosomen bzw. Vakuole/Lysosom eingeschlossen werden, um im Zuge dessen abgebaut zu werden (Mizushima, 2011). Die Erkennung der Fracht erfolgt meist durch posttranslationale Modifikation, wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung oder mittels Rezeptoren (Abb.6). Mittlerweile ist der selektive Abbau von Mitochondrien (Mitophagie), Ribosomen (Ribophagie), Endoplasmatischem Retikulum (ER-phagie), Peroxisomen (Pexophagie), Lipidtröpfchen (Lipophagie), Nukleus (Nukleophagie), Lysosomen (Lysophagie) und Bakterien (Xenophagie) bekannt (Bauckman et al, 2015; Bellu & Kiel, 2003; Hasegawa et al, 2015; Kraft et al, 2008; Lemasters, 2005; Nakatogawa & Mochida, 2015; Tasdemir et al, 2007; Weidberg et al, 2009). Einige dieser Formen wurden bisher nur in Hefe beobachtet.

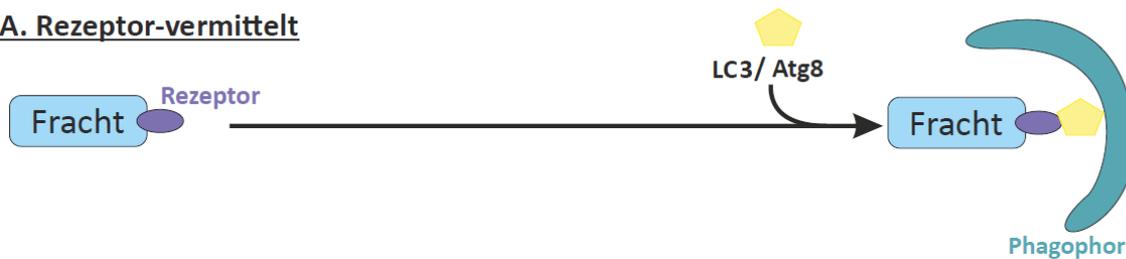
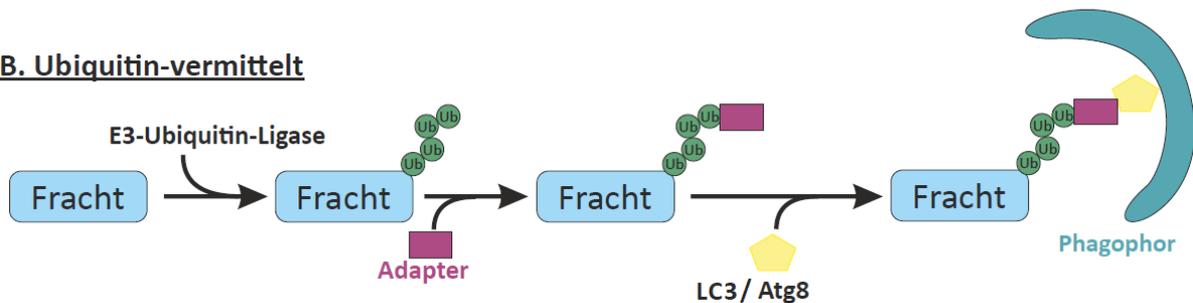
A. Rezeptor-vermittelt**B. Ubiquitin-vermittelt**

Abbildung 6: Schematische Darstellung der selektiven Autophagie. LC3/Atg8 kann direkt den Rezeptor der Fracht binden (**A**) oder wird nach Ubiquitinierung der Fracht (z.B. Mitochondrien, Ribosome) und Bindung eines Adapters an diesen rekrutiert (**B**). Im Zuge dessen bildet sich das Phagophor. Ub=Ubiquitin

1.2.1.1 Cvt-Weg

Der Cvt-Weg (engl. ‚*Cytoplasm-to-vacuole-targeting*‘) stellt eine Sonderform der selektiven Autophagie dar. Die Hydrolase Aminopeptidase I (Ape1) wird unabhängig vom sekretorischen Weg zur Vakuole transportiert (Abb. 7). Das Enzym wird als inaktive Form im Zytosol synthetisiert und anschließend in der Vakuole durch die Proteinase A (Pep4) aktiviert. Den Transport zur Vakuole bezeichnet man als Cvt-Weg, welcher bislang nur in der Bäckerhefe dokumentiert wurde. Im Zytosol erfolgt die Zusammenlagerung von prApe1-Monomeren zu einem Dodekamer. Viele prApe1-Dodekamere assemblieren zum Ape1-Komplex (Shintani et al, 2002). Der Ape1-Komplex bindet Atg19 und formt den Cvt-Komplex. Durch Interaktion zwischen Atg19 mit dem Adapter Atg11 wird der Cvt-Komplex zur PAS transportiert. Atg19 bindet Atg8-PE, das die Verpackung des Cvt-Komplexes durch eine doppelmembranlagige Struktur (Phagophor) und zur Bildung des Cvt-Vesikels führt. Nach vollständiger Ausbildung des Cvt-Vesikels, fusioniert die äußere Membran des Vesikels mit der Vakuole und entlässt die Einzelmembran (Cvt-Körper) in das Lumen. Hier erfolgt die proteolytische Reifung des Ape1 durch das Enzym Pep4 (Trumbly & Bradley, 1983). Unter nährstoffreichen Bedingungen werden ebenfalls α -Mannosidase (Ams1) und Aspartylaminopeptidase (Ape4) über den Cvt-

Weg transportiert (Hutchins & Klionsky, 2001; Yuga et al, 2011). Unter nährstoffarmen Konditionen erfolgt der Transport des proApe1 über Autophagie.

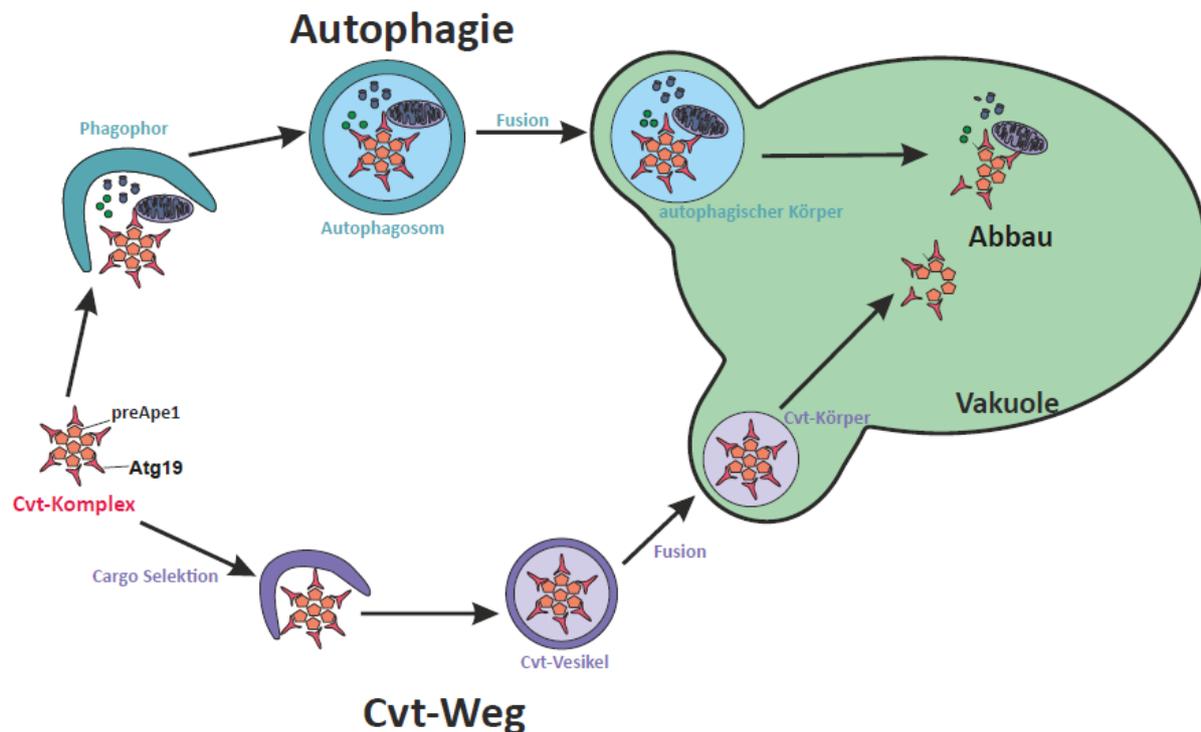


Abbildung 7: Zwei Wege der Reifung des Ape1. Dargestellt sind der Cvt-Weg und die Autophagie zur Reifung von inaktiver Aminopeptidase I (prApe1) zur aktiven Aminopeptidase I (mApe1). PrApe1 bildet unter Wachstumsbedingungen Dodekamere, die von einer Doppelmembran umschlossen werden und Cvt-Vesikel bilden (Cvt-Weg). Durch Fusion mit der Vakuole erfolgt die Reifung des prApe1 zu mApe1. Bei Nahrungsmangel erfolgt die Verpackung der Dodekamere und zytosolischen Komponenten zum Autophagosom (Autophagie), das wiederum mit der Vakuole fusioniert (Klionsky, 2005).

1.2.1.2 Ribophagie

Spezifische Konditionen wie Nährstoffmangel erfordern, dass überschüssige Ribosomen effizient abgebaut werden. Für das Recycling von Ribosomen hat die Zelle mehrere Strategien entwickelt, um strukturell und/oder funktionell mangelhafte Ribosomen abzubauen. Die Eliminierung von Ribosomen kann in allen Schritten der ribosomalen Synthese erfolgen. Der selektive Abbau von Ribosomen wurde bislang nur in Hefe dokumentiert und ist noch weitgehend unaufgeklärt. Eine neuste Studie legt nahe, dass beide ribosomalen Untereinheiten, 40S und 60S, in getrennten Mechanismen abgebaut werden (Kraft et al, 2008). So konnte gezeigt werden, dass die Deubiquitinase Ubp3 mit ihrem Co-Faktor Bre5 und zwei weiteren Proteinen (Cdc48 und Ufd3) einen Komplex bilden, der für den Abbau der 60S Untereinheit verantwortlich ist (Kraft et al, 2008). Ein Hinweis, dass dieser Komplex ebenfalls

für den Abbau der 40S Untereinheit verantwortlich ist, konnte jedoch nicht gezeigt werden. Neuere Studien demonstrierten eine antagonistische Regulation der 60S Ribophagie. Durch die Ubiquitinierung von Rpl25, einem Protein der 60S Untereinheit, durch die E3-Ligase Ltn1 wird der Abbau der großen ribosomalen Untereinheit inhibiert. Auf der anderen Seite fördert die Deubiquitinierung von Rpl25 durch die Ubiquitin-spezifische Protease Ubp3 die 60S Ribophagie (Ossareh-Nazari et al, 2014). Jedoch ist unklar wie Ribosome als ‚cargo‘ für diese spezifische Form der selektiven Autophagie markiert werden.

1.2.1.3 Retikulophagie/ER-phagie

Studien demonstrieren, dass Teile des Endoplasmatischen Retikulums (ER) selektiv abgebaut werden können, die sogenannte ER-phagie (Cebollero et al, 2012; Tasdemir et al, 2007). Dieser autophagische Prozess soll als zelluläre Antwort auf ER-Stress, Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen im ER, und der Aufrechterhaltung der ER-Homöostase dienen. In Hefe induziert ER-Stress die Ausdehnung des Endoplasmatischen Retikulums und die Bildung von ER-Windungen (engl. ‚whorls‘). Diese ER-Windungen werden selektiv und unabhängig vom Autophagosom durch die Vakuole aufgenommen und abgebaut (Schuck et al, 2014). Der Mechanismus ist somit äquivalent zur Mikroautophagie (Kapitel 1.2), erfordert jedoch nicht die grundlegenden Komponenten der Autophagie-Maschinerie (engl. ‚core autophagy machinery‘). Der Mechanismus hinter diesem autophagischen Prozess ist noch weitgehend unverstanden. In den letzten Jahren konnten einige regulatorische Komponenten der ER-Phagie identifiziert werden. Beispielsweise soll die Ypt/Rab GTPase Ypt1 zusammen mit Trs85, eine Komponente des Komplexes TRAPP III (engl. ‚transport protein particle‘) und Atg11 für die ER-phagie in Hefe notwendig sein (Lipatova et al, 2013). Mochida *et al.* identifizierten Atg40, das angereichert im kortikalen und cytoplasmatischen ER vorliegt (Abb.8), mit Atg8 interagiert und in den Abbau dieser ER-Subdomänen involviert sein soll (Mochida et al, 2015). Atg40 ist vermutlich das funktionelle Gegenstück von FAM134B, ein ER-phagie-Rezeptor in Säugetieren, das an der sensorischen Neuropathie beteiligt ist (Li et al, 2016).

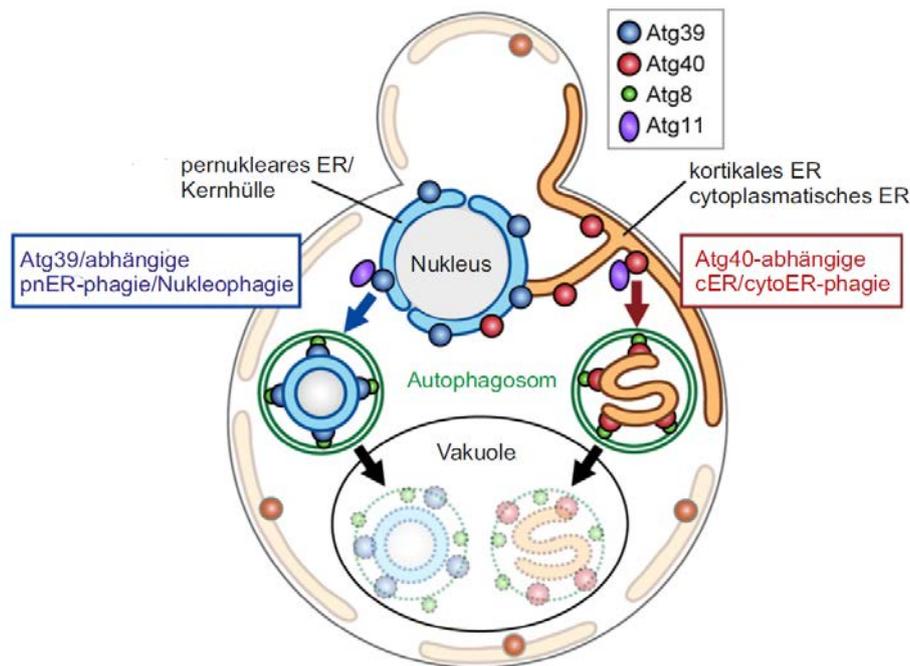


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Atg39 – und Atg40-vermittelten Nukleophagie und ER-phagie (adaptiert nach (Mochida et al, 2015)). Atg39 ist am perinuklearem ER (pnER) bzw. Kernhülle lokalisiert und vermittelt die Umschließung dieser ER-Subdomäne durch das Phagophor und Bildung des Autophagosoms. Atg40 ist hauptsächlich im kortikalen ER (cER) und dem cytoplasmatischem ER (cytoER) lokalisiert und ermöglicht die Sequestrierung dieser ER-Domänen.

1.3 Mitophagie

Zahlreiche Studien demonstrieren, dass Mitophagie, der selektive Abbau von Mitochondrien, ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Qualitäts- und Quantitätskontrolle ist. Defekte in diesem System führen zu humanen Krankheiten, wie z.B. Morbus Parkinson und Wolfram Syndrom 2 (Jin & Youle, 2012; Kanki & Klionsky, 2010; Narendra et al, 2012). Bereits 1957 wurden Mitochondrien im Autophagosom mikroskopiert (Clark, 1957). Seit dieser Zeit wurden zahlreiche Studien zur Aufklärung des Mechanismus an Säugern und Hefe durchgeführt. Mechanistisch lassen sich zwei prinzipielle Wege unterscheiden: (1) eine Rezeptor-vermittelte (Abb. 9, links) und (2) eine Ubiquitin-vermittelte Mitophagie (Abb. 9, rechts).

Beim Rezeptor-vermittelten Prozess interagiert ein mitochondrial lokalisierter Rezeptor direkt mit einem Markerprotein der autophagosomalen Membran und führt damit selektiv zum Einschluss des Organells. Bei der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie erfolgt zuerst eine

Ubiquitinierung von mitochondrialen Außenmembranproteinen durch eine E3-Ubiquitin-Ligase. Diese werden von einem bifunktionalen Adapterprotein registriert, das zum einen ubiquitinierte Proteine und zum anderen ein autophagosomales Markerprotein erkennt und somit indirekt rekrutiert (Abb. 9)

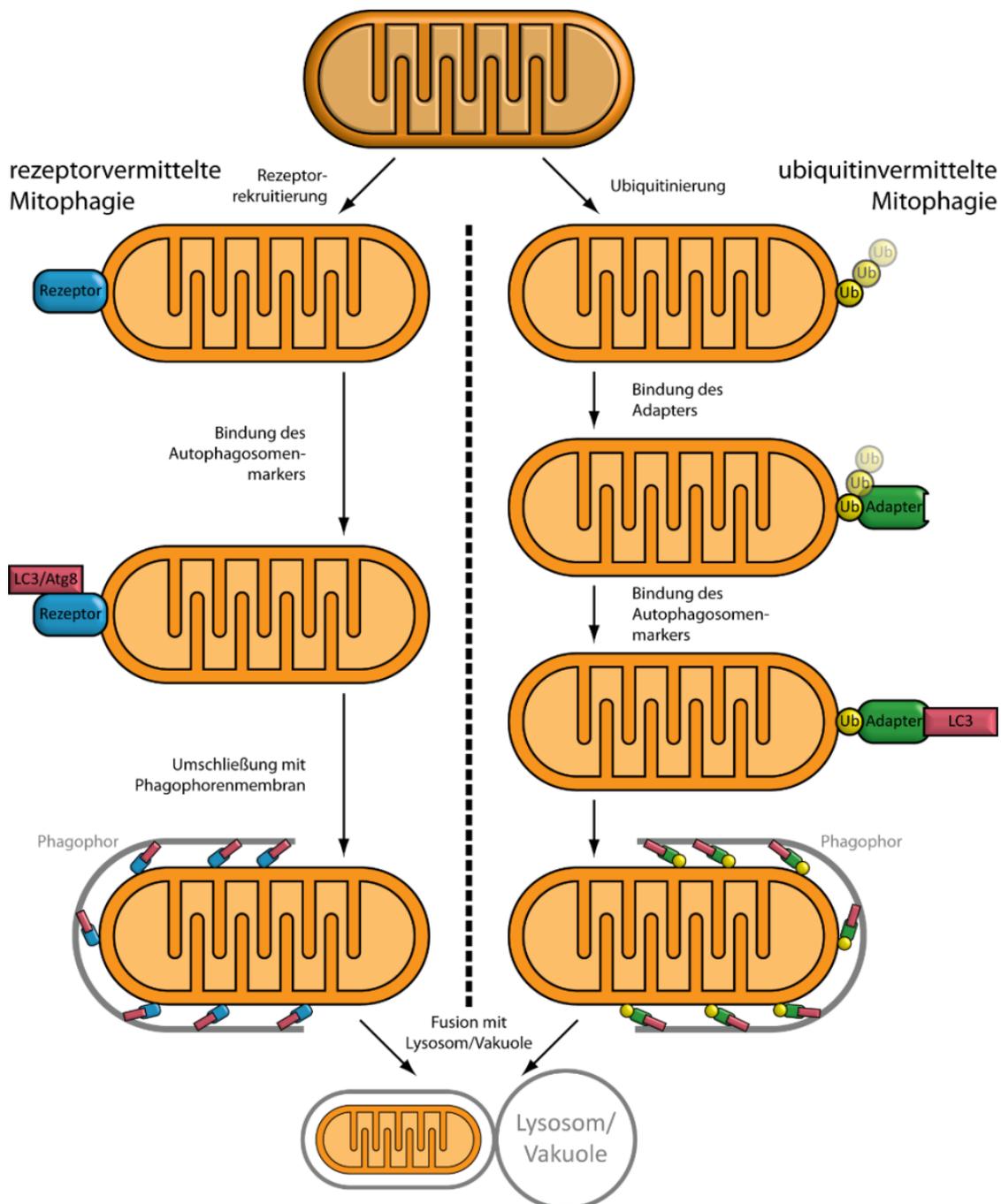


Abbildung 9: Schematische Darstellung der zwei Reaktionswege der Mitophagie (adaptiert nach (Tan et al, 2016)) gestellt sind die zwei prinzipiellen Wege des mitochondrialen Abbaus. Bei der Rezeptorvermittelten Mitophagie wird durch ein Rezeptor, der mit LC3/Atg8 interagiert, die Mitophagie induziert (links). Beim zweiten Weg erfolgt zuerst eine Ubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen, die dann mit dem Adapter interagieren (rechts). Ub = Ubiquitin

1.3.1 Mitophagie in Säugerzellen

1.3.1.1 Rezeptor-vermittelte Mitophagie

In Säugern existieren zwei Arten Mitophagie-induzierender Rezeptoren (Liu et al, 2014). Die erste Gruppe umfasst das NIP3-ähnliche Protein X (NIX) und BNIP3 (engl. ‚*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3*‘) und zur zweiten Art zählt der Rezeptor FUNDC1 (engl. ‚*FUN14 domain-containing protein 1*‘). Alle drei Proteine besitzen wie Atg32 die typische W/YXXI/L/V Sequenz (LC3-interacting region (LIR)-Sequenz). Die Rezeptoren interagieren jeweils direkt durch die LIR-Sequenz mit dem autophagosomalen Markerprotein LC3 (engl. ‚*microtubule-associated protein 1 light chain 3*‘), um die Mitophagie zu vermitteln (Abb. 8). BNIP3 und NIX sind BCL-2 (engl. ‚*B-cell lymphoma 2*‘)-ähnliche Proteine, die zur mitochondrialen Außenmembran translozieren und dort als Rezeptor fungieren. Beide Makromoleküle sind an der Regulation der Apoptose und Nekrose beteiligt (Bursch et al, 2008; Sowter et al, 2001). Die Expression von NIX ist während der Retikulozytenentwicklung verstärkt und verantwortlich für die Entfernung der Mitochondrien der roten Blutkörperchen (Sandoval et al, 2008). Ausgelöst durch Hypoxie induzieren sowohl NIX als auch BNIP3 den selektiven Abbau von Mitochondrien. Zhu *et al.* belegen, dass die posttranslationale Phosphorylierung von BNIP3 an Serin-17 und Serin-24 die Initiation der Mitophagie begünstigt (Zhu et al, 2013). Der Rezeptor FUNDC1 ist ein mitochondriales Außenmembranprotein mit drei Transmembrandomänen. Die Aktivität des Rezeptors wird durch seinen Phosphorylierungsstatus reguliert. Die Dephosphorylierung von FUNDC1 an Serin-13 durch PGAM5 hat eine erhöhte Affinität zu LC3 zur Folge, sodass durch nachfolgende FUNDC1-LC3 Interaktion Mitophagie induziert wird (Chen et al, 2014). Studien zeigten, dass FUNDC1 neben dem selektiven Abbau von Mitochondrien auch in der mitochondrialen Dynamik durch Interaktion mit Drp1 und Initiierung der mitochondrialen Fission involviert ist (Chen et al, 2016; Wu et al, 2016). Das funktionelle Homolog zum Heferezeptor Atg32, Bcl-2-ähnliche Protein 13 (BCL2-L13), induziert in Säugern die mitochondriale Fragmentierung und Mitophagie (Murakawa et al, 2015). Exprimiert in Hefe vermittelt BCL2-L13 den selektiven Abbau der Mitochondrien.

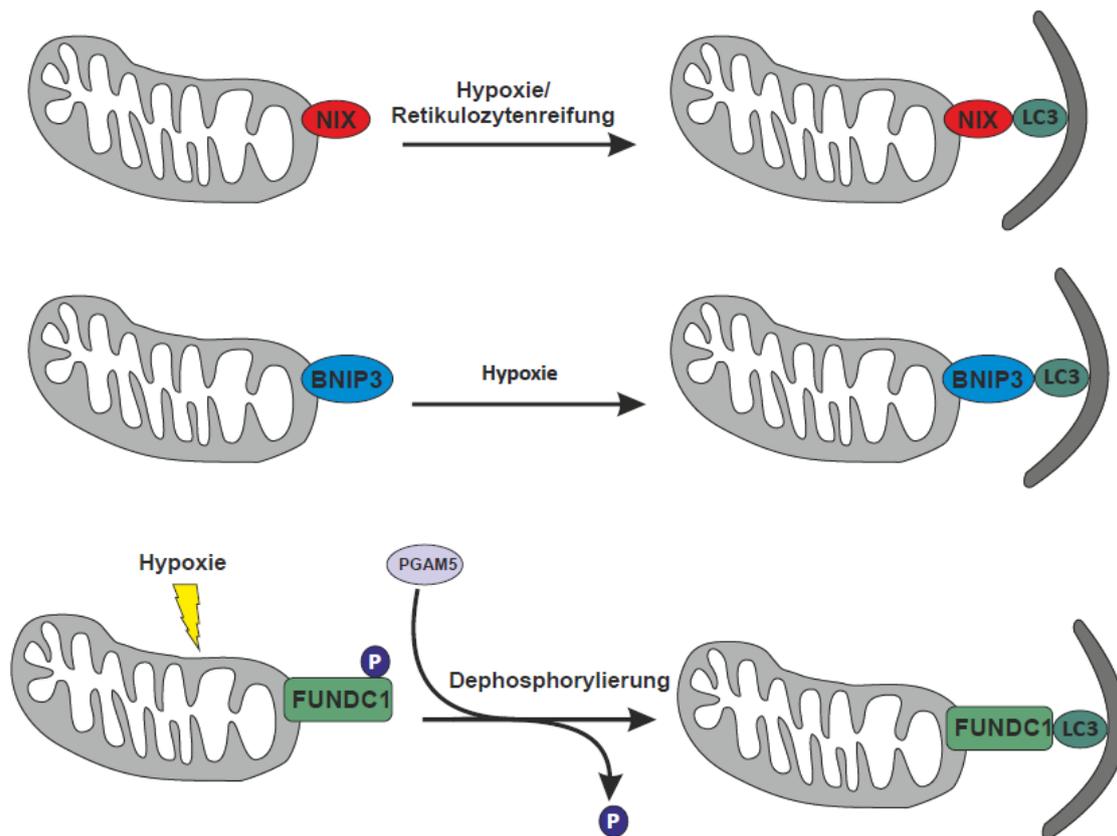


Abbildung 10: Rezeptor-vermittelte Mitophagie in Säugern. Schematische Darstellung der Mitophagie-Induktion in Säugern vermittelt durch die mitochondrialen Rezeptoren NIX, BNIP3 und FUNDC1, die direkt mit LC3 interagieren und den selektiven Abbau von Mitochondrien induzieren. Die Aktivierung des autophagischen Prozesses erfolgt durch unterschiedliche Reize (Hypoxia, Dephosphorylierung).

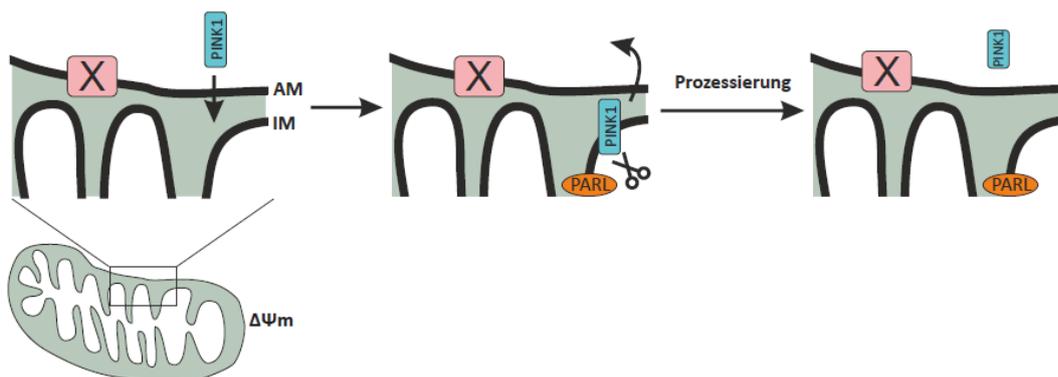
1.3.1.2 Ubiquitin-vermittelte Mitophagie

Diese Form der Mitophagie wird häufig auch als Pink1/Parkin-Weg bezeichnet (Narendra et al, 2008). In funktionellen Mitochondrien transloziert die Kinase Pink1 durch die mitochondriale Außenmembran und wird in der inneren Membran von PARL prozessiert und abgebaut (Abb.11). Dysfunktionale Mitochondrien, die ein verändertes Membranpotential aufweisen, stabilisieren an der äußeren Membran die Kinase Pink1. Als Folge der Pink1-Akkumulation phosphoryliert das Enzym Ubiquitinketten von mitochondrialen Außenmembranproteinen und die E3-Ligase-Parkin am Serin-65. Phosphoryliertes Ubiquitin dient unter anderem der Rekrutierung von Parkin und als Parkin-Rezeptor, aber auch als allosterischer Aktivator der E3-Ligase-Parkin (Chin & Li, 2016; Okatsu et al, 2015). Studien zeigten, dass Parkin in einer inaktiven Form vorliegt und durch Bindung des phosphorylierten Ubiquitins eine Konformationsänderung erfährt (Kazlauskaite et al, 2014; Kazlauskaite et al,

2015; Sauve et al, 2015). Dies zusammen mit der Phosphorylierung durch Pink1 aktiviert Parkin (Kumar et al, 2015). Nach der Aktivierung, ubiquitiniert Parkin die zwei Schlüsselfaktoren der mitochondrialen Fusion, Mitofusion 1 und Mitofusion 2, aber auch andere mitochondriale Proteine (Gegg et al, 2010; Jin & Youle, 2012). Die ubiquitinierten Außenmembranproteine binden den Adapter p62, Optineurin oder NDP52 und rekrutieren schließlich Proteine der LC3-Familie. Darüber hinaus dienen die Produkte der E3-Ligase-Parkin als Substrate für die Kinase Pink1 und führen somit zu einer starken positiven Rückmeldung.

Einen weiteren wichtigen Teil der mitochondrialen Qualitätskontrolle in Säugern stellen die Deubiquitinasen Usp8, Usp15 und Usp30 dar. Die Enzyme Usp30 und Usp15 wirken antagonistisch zur Mitophagie-induzierenden E3-Ligase-Parkin.

Funktionelles Mitochondrium



Geschädigtes Mitochondrium

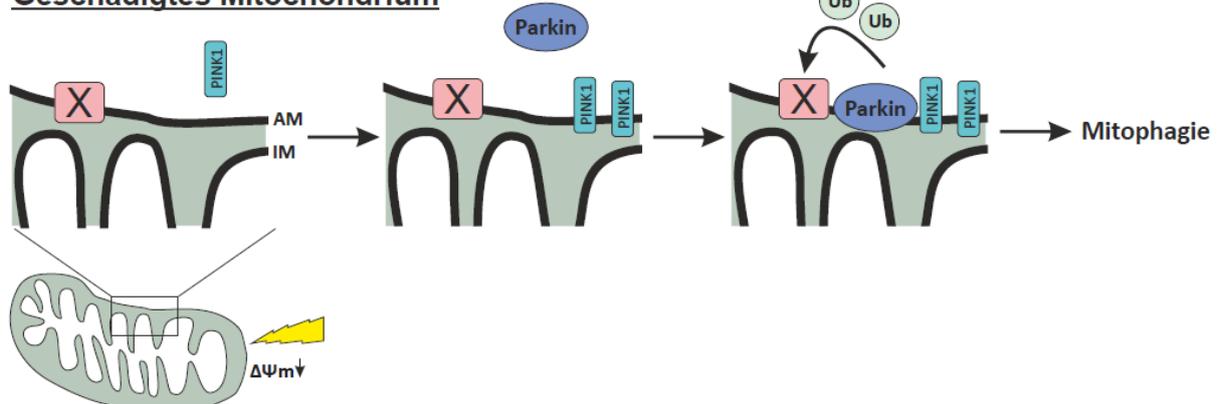


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Pink1/Parkin-Wegs in funktionellen und geschädigten Mitochondrien. Pink1 transloziert durch die Membran funktioneller Mitochondrien und wird in der inneren Membran (IM) von PARL prozessiert und abgebaut. Schädigung der Mitochondrien führt zur Pink1-Akkumulation auf der mitochondrialen Außenmembran (AM) und zur Rekrutierung der E3-Ligase-Parkin, die mitochondriale Protein (X) ubiquitiniert und zur Induktion der Mitophagie führt. Ub= Ubiquitin

Durch das Entfernen von Parkin-vermittelte Ubiquitinreste von mitochondrialen Außenmembranproteinen durch die beiden Deubiquitinasen wird der selektive Abbau von Mitochondrien inhibiert (Bingol et al, 2014; Cornelissen et al, 2014). Usp8 eliminiert K6-verknüpfte Ubiquitinketten von Parkin und trägt dadurch zur effektiven Mobilisierung der Ligase zum Mitochondrium bei (Durcan et al, 2014).

1.3.2 Mitophagie in Hefe

1.3.2.1 Rezeptor-vermittelte Mitophagie

Der Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Mitophagie ist am besten in Hefe untersucht. Neben den grundlegenden Komponenten der Autophagie-Maschinerie, die auch für die nicht-selektive Autophagie essentiell sind, werden noch weitere zum Teil spezifische Komponenten benötigt. Nach Induktion der Mitophagie wird der mitochondriale Rezeptor Atg32 durch eine Kinase am Serin-114 bzw. Serin-119 phosphoryliert (Aoki et al, 2011). Diese posttranslationale Modifikation ist notwendig für die Interaktion mit dem zytosolischen Adapterprotein Atg11. Dann rekrutiert Atg11 das Mitochondrium zur prä-autosomalen Struktur, wo die isolierende Membran generiert wird (Aoki et al, 2011). Die Interaktion zwischen Atg32 und Atg8 fördert die Expansion des Phagophors und führt zum Einschluss des Mitochondriums. Anschließend fusioniert das Autophagosom mit der Vakuole und das Mitochondrium wird degradiert.

Der Rezeptor Atg32

Atg32 ist ein 59 kDa großes mitochondriales Membranprotein mit drei Hauptdomänen: einer zytosolischen N-terminalen Domäne, einer einfachen helikalen Transmembrandomäne und einer C-terminalen mitochondrialen Intermembranraumdomäne (Okamoto et al, 2009). Die Transmembrandomäne dirigiert das Protein zum Mitochondrium und insertiert es in die äußere Membran. Die zytosolische Domäne des Atg32 ist entscheidend für die Interaktion mit Atg8 und Atg11. Sie enthält eine evolutionär konservierte W/YXXI/L/V Sequenz, die sogenannte „*Atg8-family interacting motif*“ (AIM), die notwendig für die Reaktion mit der autophagosomalen Komponente Atg8 ist (Okamoto et al, 2009). Neuste Studien zeigen, dass die AIM nicht absolut notwendig für die Mitophagie ist und dass die Atg32-Atg8 Interaktion als Unterstützung für die Autophagosomen-Bildung dient (Aoki et al, 2011; Kondo-Okamoto

et al, 2012). Atg32 verfügt auch über ein I/VLS Motiv, das wichtig für die Bindung an Atg11 ist (Aoki et al, 2011). Physikalisch interagiert Atg32 mit seinem I/VLS Motiv mit der C-terminalen Superhelixdomäne des Atg11. Die Intermembranraumdomäne wird von der mitochondrialen Protease Yme1 prozessiert, was die Interaktion zwischen Atg32 mit Atg11 reguliert (Wang et al, 2013). Nach Induktion der Mitophagie wird das Phosphorprotein Atg32 an der zytosolischen Domäne an zwei Serin-Resten, Serin-114 und Serin-119, von Caseinkinase 2 (CK2) phosphoryliert (Kanki et al, 2013). Die Phosphorylierung ist essentiell für die Interaktion mit Atg11. Jedoch ist die Regulation der CK2-vermittelten Phosphorylierung unklar.

Mitophagie-Induktion und Regulation

Gegenwärtig existieren zahlreiche Methoden zur Induktion der Mitophagie in Hefe. Keine dieser Verfahrensweisen ist selektiv, so dass neben dem spezifischen Abbau von Mitochondrien auch andere autophagische Prozesse initiiert werden. Für die Induktion werden die Zellen unter respiratorischen Bedingungen in nicht-fermentativem Medium kultiviert. Als Kohlenstoffquellen dient häufig Glycerin oder Lactat (Kanki et al, 2011). Bereits 2007 zeigte die Arbeitsgruppe um Tal *et al.*, dass die Mitophagie durch dreitägiges Wachstum in der stationären Phase induziert werden kann (Kanki & Klionsky, 2008; Tal et al, 2007). Darüber hinaus lässt sich durch den Einsatz pharmakologischer Substanzen wie Rapamycin oder Stickstoffmangel (engl. ‚nitrogen starvation‘) der Abbau von Mitochondrien einleiten (Mendl et al, 2011). Rapamycin inhibiert den TORC1 Komplex, so dass Atg13 dephosphoryliert und die autophagische Maschinerie gestartet wird (siehe Kapitel 1.2.1). Bei der ‚nitrogen starvation‘ Induktionsmethode wird die Mitophagie durch Kultivierung der Zellen in einem stickstoffarmen Medium und zusätzlichem Wechsel auf eine fermentative Kohlenstoffquelle, wie Glukose, induziert. Neben diesen verschiedenen Konditionen gibt es noch zahlreiche Hinweise, dass geschädigte Mitochondrien Mitophagie einleiten. Störungen in der F₀F₁-ATPase Biogenese oder osmotisches Schwellen der Mitochondrien, verursacht durch Deletion des mitochondrialen K⁺/H⁺-Austauschers Mdm38, bewirken einen vermehrten Abbau der Mitochondrien (Nowikovsky et al, 2007; Priault et al, 2005). Die Depolarisation der Mitochondrien durch einen Entkoppler wie Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) löst in Hefe, anders als in Säugetieren, den Abbau der Mitochondrien nicht aus (Kanki et al, 2009b; Kissova et al, 2004).

Im Normalzustand wird der Hauptanteil der Mitochondrien durch Mitophagie nicht abgebaut, so dass es Mechanismen geben muss, die zwischen gesunden und geschädigten bzw. überzähliger Mitochondrien unterscheiden. Zwei voneinander unabhängige Studien dokumentierten, dass N-Acetylcystein (NAC) die Mitochondrien vor einem selektiven Abbau schützt (Deffieu et al, 2009; Okamoto et al, 2009). Die mitochondriale Morphologie bzw. der Level an reaktivem Sauerstoffspezies könnten Faktoren sein, die es der Zelle erlauben, zwischen gesunden und geschädigten Mitochondrien zu unterscheiden.

Je nach verwendeter Induktionsmethode wurden unterschiedliche Modulatoren für die Mitophagie gefunden. Die Deletion des Gens *ATG33*, welches für das mitochondriale Außenmembranprotein Atg33 codiert, reduziert den selektiven mitochondrialen Abbau unter Nährstoffmangel und hemmt die Induktion bei Kultivierung in der stationären Phase (Kanki et al, 2009a). Atg33 ist in allen Hefestämmen konserviert, aber für höhere Eukaryoten existiert kein bekanntest Homolog. Die Deletion von *FMC1* induziert und das Fehlen der Proteine Uth1, Aup1 oder Rtg3 inhibiert die Mitophagie. Fmc1 ist ein mitochondriales Matrixprotein, das für die korrekte Assemblierung der F_1F_0 -ATPase verantwortlich ist. Die Deletion des Gens führt zum Zusammenbruch des Elektronengradienten unter anaeroben Bedingungen. Seine Wirkung auf die Mitophagie ist umstritten, da entgegengesetzte Effekte auf den selektiven Abbau von Mitochondrien beobachtet wurden. Untersuchungen durch Kanki *et al.* zeigten, dass die Deletion von *FMC1* zu einem leichten Defekt der Mitophagie führt (Kanki et al, 2009a). Dagegen beobachtete eine andere Studie, dass $\Delta fmc1$ eine erhöhte Mitophagie aufwies (Priault et al, 2005). Kissova *et al.* demonstrierten, dass bei Deletion des mitochondrialen Proteins Uth1 und einem Wechsel von stickstoffreichem respiratorischem Medium zu einem glukosehaltigem Stickstoffmangelmedium die Aktivität des mitochondrialen Abbaus reduziert ist (Kissova et al, 2004). Die mitochondriale Phosphatase Aup1 wurde unter stationären Wachstumsbedingungen als notwendig für die Mitophagie gefunden (Tal et al, 2007). Darüber hinaus scheint Aup1 die selektive Eliminierung von Mitochondrien durch Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors Rtg3 zu regulieren (Journo et al, 2009). Über die Beteiligung des Proteins Dnm1 an der Mitophagie gibt es widersprüchliche Aussagen. Auf der einen Seite zeigte eine Studie, dass die Dnm1-vermittelte mitochondriale Fission verantwortlich ist für den Abbau von Mitochondrien unter stickstoffarmen Bedingungen (Mao et al, 2013). Auf der anderen Seite konnten Mendl *et al.* nachweisen, dass der mitochondriale

Teilungsapparat an der Rapamycin-induzierten Mitophagie nicht involviert ist (Mendl et al, 2011).

1.3.2.2 Ubiquitin-vermittelte Mitophagie

Kürzlich belegt eine Studie, dass die Ubiquitin-vermittelte Mitophagie evolutionär konserviert ist und auch in *S.cerevisiae* existiert (Müller et al, 2015). Müller *et al.* demonstrierten, dass der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex als Inhibitor des selektiven mitochondrialen Abbaus in Hefe fungiert. So könnte durch Deubiquitinierung von mitochondrialen Außenmembranproteinen, homolog zum Säugermodell, übermäßige Mitophagie blockiert werden. Ebenfalls dokumentierte die Studie, dass die Deletion von Genen, die für eine E3-Ligase oder E2-Enzyme codieren, zur Hemmung der Mitophagie führt (Müller et al, 2015). Expression der humanen Ligase Parkin in *S. cerevisiae* induziert eine verstärkte Mitophagie und erhöht die Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Pereira et al, 2015).

1.4 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein evolutionär konserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa. Der Mechanismus der Ubiquitinierung, die Übertragung von Ubiquitin auf ein Zielprotein, wird durch drei Enzyme (E1-, E2- und E3-Enzym) katalysiert (Abb. 11). Diese reversible posttranslationale Modifikation vermittelt zahlreiche zelluläre Funktionen. Dazu zählt der Proteinabbau durch das 26S Proteasom, DNA Reparatur, Autophagie, Transkription oder die Endozytose (Jackson & Durocher, 2013; Kirkin et al, 2009; Strous & Govers, 1999). Die Reaktionskaskade startet durch die Thioesterbindung eines Ubiquitin-Moleküls und dem katalytisch aktiven Cystein des aktivierenden Enzyms (E1-Enzym). Diese Reaktion erfolgt unter Verbrauch von ATP. In der Bäckerhefe kodiert *UBA1* als einziges Gen für ein E1-Enzym (McGrath et al, 1991). Durch Interaktion des E1-Enzyms mit dem katalytisch aktiven Cystein des konjugierenden Enzyms (E2-Enzym) wird Ubiquitin übertragen. Dabei reagiert der Carboxyterminus (C-Terminus) des Ubiquitin-Moleküls mit der Thiolgruppe des Cystein-Restes unter Abspaltung von Wasser. In *Saccharomyces cerevisiae* sind 13 E2-Enzyme bekannt. Im

letzten Schritt verknüpft das E3-Enzym durch Ausbildung einer Isopeptidbindung das C-terminale Ende des Ubiquitins mit einem Lysin-Rest des Substrates. Die Familie der E3-Enzyme umfasst 60-100 Ligasen (in Hefe) und lässt sich in zwei Klassen differenzieren: die HECT- (engl. ‚*Homologous to E6AP Carboxy-Terminus*‘) und die RING- (engl. ‚*Really Interesting New Gene 1*‘) Enzyme. HECT-Ligasen übernehmen durch ihr katalytisch aktives Cystein das Ubiquitin vom konjugierenden E2-Enzym und transferieren den C-Terminus des Ubiquitin-Moleküls auf einen Lysin-Rest des Zielproteins unter Ausbildung einer Isopeptidbindung. RING-Ligasen sind bifunktionell und binden das mit Ubiquitin verknüpfte E2-Enzym und das Substrat, um Ubiquitin auf das Zielprotein zu übertragen (Sadowski et al, 2012). Die Ubiquitinierung erfolgt häufig am Lysin-Rest des Substrats. Studien belegen ebenfalls die N-terminale Ubiquitinierung, sowie vereinzelt Reaktionen mit Serin-, Threonin- oder Cystein-Resten des Zielproteins durch Bildung von Ester- oder Thioesterbindungen (Coulombe et al, 2004; Wang et al, 2007). Strukturell weist Ubiquitin sieben Lysin-Reste an den Positionen 6, 11, 27, 29, 33, 48 und 63 auf. In Hefezellen kommen K48-verknüpfte Ketten am häufigsten vor (Xu et al, 2009). Der N-Terminus kann jedoch auch für eine weitere Verknüpfung genutzt werden. Abhängig vom Zielprotein (Ubiquitin selbst oder ein anderes Protein) und dem Lysin-Rest spricht man von Mono-, Oligo-, Multi- oder Polyubiquitinierung (Abb.12). Wobei die verschiedenen Ubiquitinmodifikationen unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben. Die K48-verknüpfte Kette dient der klassischen Erkennung des Zielproteins durch das 26S-Proteasom mit anschließender Degradation (Fang et al, 2016; Weissman et al, 2011). Verknüpfungen durch das Lysin der Position 63 spielen unter anderem eine Rolle in der Endozytose von Membranproteinen und im DNA-Reparaturprozess (Hofmann & Pickart, 1999; Mukhopadhyay & Riezman, 2007).

Die Ubiquitinierung ist ein reversibler Prozess. Die Abtrennung eines Ubiquitin-Moleküls von einem Zielprotein erfolgt durch Deubiquitinasen (DUBs). DUBs sind Proteasen, die Ubiquitin bzw. Ubiquitinketten vom Zielprotein eliminieren. Diese Enzyme weisen zahlreiche zelluläre Funktionen auf, inklusive der DNA Reparatur, Genexpression oder Apoptose. DUBs werden in zwei Hauptgruppen klassifiziert: Cysteinproteasen und Metalloproteasen DUBs (Nijman et al, 2005). Die Cysteinproteasen DUBs werden untergliedert in Ubiquitin-spezifische Proteasen (USPs), Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (UCHs), OTUs (engl. ‚*ovarian tumor proteasen*‘) und Machado-Joseph- Domänenproteasen (MJDs) (Nijman et al, 2005).

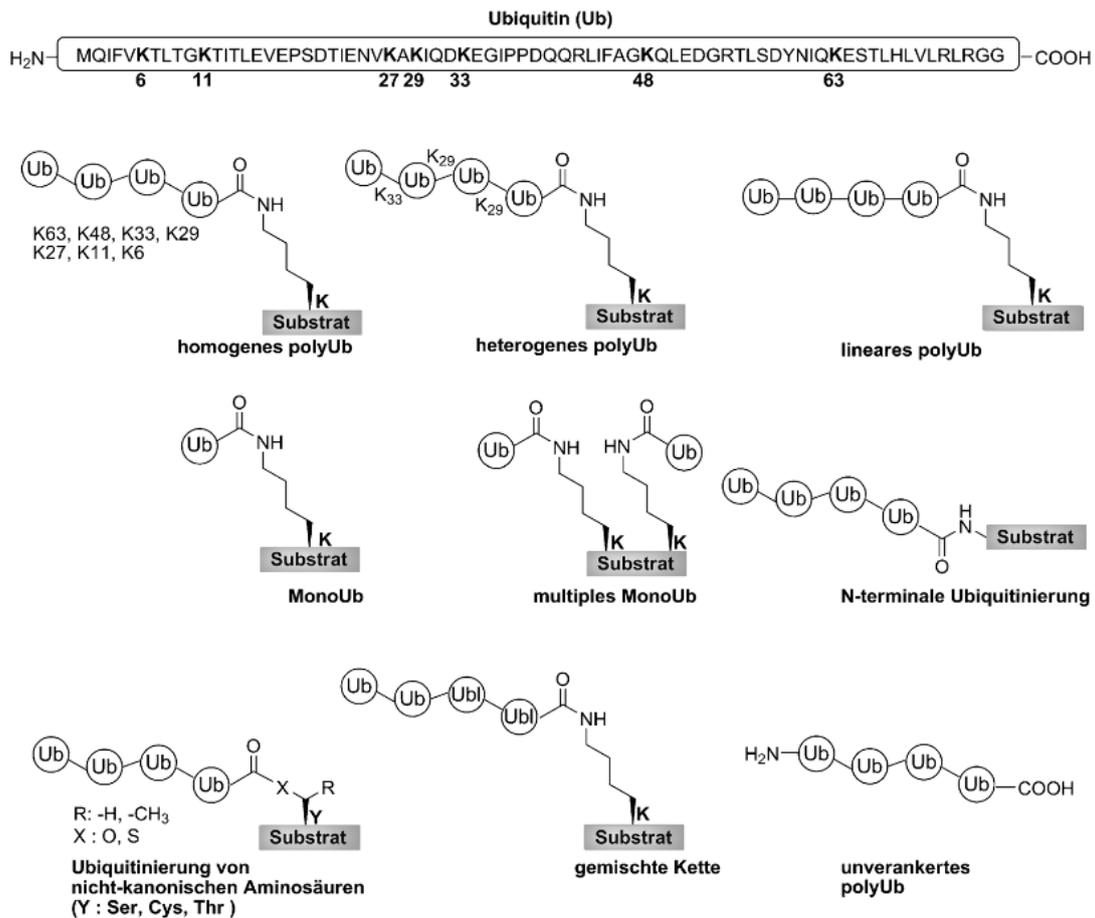


Abbildung 12: Die Vielfalt an Ubiquitinierungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Ubiquitinketten. Dargestellt sind die Aminosäuresequenz des Ubiquitin, sowie die verschiedenen Möglichkeiten an Ubiquitinketten. Ub= Ubiquitin (adaptiert nach Spasser und Brik, Angew. Chem.2012,124, 6946 – 6969).

1.4.1 Ubiquitin kodierende Gene in Hefe

In *Saccharomyces cerevisiae* wird Ubiquitin von vier Genen, *UBI1-UBI4*, kodiert (Abb.13). Lediglich *UBI3* ist ein essentielles Gen. *UBI1-UBI3* kodieren für Fusionsproteine, in denen Ubiquitin mit dem Protein L40 der großen ribosomalen Untereinheit (Ubi1 bzw. Ubi2) oder mit S31 der kleinen ribosomalen Untereinheit (Ubi3) verknüpft ist. Unter normalen, stressfreien Wachstumsbedingungen wird der Hauptteil an Ubiquitin von *UBI1* bis *UBI3* kodiert (Finley et al, 1989). Stress, wie Hitzeschock oder Nährstoffmangel, stimuliert die Induktion von *UBI4* (Finley et al, 1987; Ozkaynak et al, 1987). *UBI4* ist ein Polyubiquitin-kodierendes Gen und kodiert für eine lineare Kette aus fünf Ubiquitin-Molekülen, die von Kopf-nach-Schwanz verbunden sind. Erst durch Spaltung der Polypeptide entsteht freies

Ubiquitin. Die Deubiquitinasen, die Ubiquitin von den Fusionsproteinen und der Polyubiquitinkette freisetzen, wurden bislang noch nicht identifiziert.

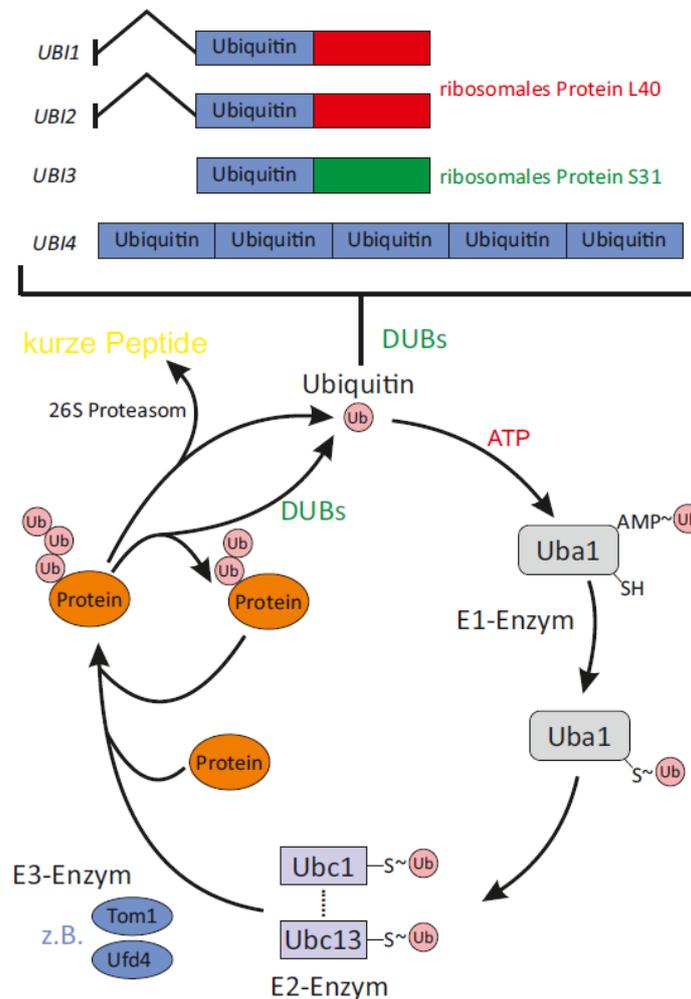


Abbildung 13: Das Ubiquitin-System der Bäckerhefe. *UBI1* und *UBI2* enthalten ein Intron und kodieren für ein Ubiquitin fusioniert mit einem ribosomalen Protein L40A. Das Gen *UBI3* exprimiert ebenfalls ein Fusionsubiquitin, das mit dem ribosomalen Protein S31 assoziiert ist. *UBI4* kodiert für eine lineare Kette bestehend aus fünf Ubiquitin-Molekülen. Durch eine ATP-abhängige Reaktion wird Ubiquitin auf ein E1-Enzym (Uba1) übertragen. Anschließend überträgt Uba1 Ubiquitin auf eins der dreizehn Ubiquitin-konjugierten E2-Enzyme, das wiederum mit Hilfe des E3-Enzyms Ubiquitin auf ein Zielprotein transferiert. DUBs= Deubiquitinasen

Im Vergleich dazu besitzt das menschliche Genom ebenfalls vier unterschiedliche Ubiquitin-kodierende Gene: *UBA52*, *RPS27A*, *UBB* und *UBC*. Die Gene *UBA52* und *RPS27A* kodieren jeweils für ein Ubiquitin fusioniert mit dem ribosomalen Protein L40 oder S27A. *UBB* und *UBC* kodieren jeweils für ein Polyubiquitin.

1.5 Zielsetzung

Dysfunktionale Mitochondrien sind mit zahlreichen humanen Krankheiten, u.a. Morbus Parkinson, Alzheimer, Diabetes oder Krebs, assoziiert (Orth & Schapira, 2001; Patti & Corvera, 2010; Winklhofer, 2014). Die Parkinson-Krankheit kann in einigen Fällen auf eine Mutation in den Genen, die für Pink1 und Parkin kodieren, zurückzuführen sein (Abeliovich & Flint Beal, 2006; Bueler, 2010; Dawson & Dawson, 2003). Beide Proteine sind essentielle Komponenten der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie in Säugerzellen. In Hefe ist dieser prinzipielle Induktionsweg des selektiven Abbaus der Mitochondrien noch weitgehend unaufgeklärt. Zu Beginn dieser Arbeit konnte in Kooperation mit Matthias Müller der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex als Inhibitor der selektiven Eliminierung von Mitochondrien identifiziert (Müller et al, 2015). Dieser Befund ist erstaunlich und demonstrierte zum ersten Mal die indirekte Notwendigkeit der Ubiquitinierung in der Induktion der Mitophagie. Der Mechanismus hinter dieser Regulation ist bislang unerforscht. Daher ist es wichtig die Rolle der Ubiquitinierung und Deubiquitierung in der Regulation der Mitophagie in der *S.cerevisiae* zu erforschen. Dabei sollten die nachfolgenden generellen Ziele verfolgt werden:

- 1.) Bestimmung der Rolle der Deubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen vermittelt durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex in der Rapamycin-induzierten Mitophagie
- 2.) Identifikation des Substrats und die Rolle der Deubiquitinierung des Substrats in der Mitophagie
- 3.) Bestimmung des Einflusses der drei nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene *UBI1*, *UBI2* und *UBI4* auf die nicht-selektive Autophagie, Mitophagie und andere Formen der selektiven Autophagie (Ribophagie, ER-Phagie und Cvt-Pathway)
- 4.) Ermittlung der Abhängigkeit der Ubiquitin-vermittelte Mitophagie von der Rezeptor-vermittelten Mitophagie

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen würden generell zu einem detaillierterem Verständnis der Regulation des selektiven Abbaus von Mitochondrien in *S.cerevisiae* verhelfen. Insbesondere würden die Resultate, Hinweise auf die mechanistischen Vorgänge in der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie liefern. Zudem ist die Bäckerhefe ein weitverbreitetes, gut untersuchtes Modellorganismus. Durch Übertragen der Resultate auf Säugerzellen, könnte

dies dazu beitragen ein besseres Verständnis des molekularen Mechanismus der Mitophagie in Säugern und die Verbindung in der Ausbildung von humanen Erkrankungen zu erhalten.

2 Methoden und Material

2.1 Chemikalienliste

Chemikalie	Firma
Acrylamid/Biacrylamid (Rotiphorese Gel 40 (37,5:1))	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Agar	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Agarose	<i>Biozym Scientific GmbH</i>
Agarose (niedrige Schmelztemperatur)	<i>Biozym Scientific GmbH</i>
Aminosäuren Drop out Supplement	<i>Clontech Laboratories, Inc.</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Ampicillin	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
BCA Protein Assay Kit	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
Bromophenolblau	<i>Merck KGaA</i>
Calciumchlorid-Dihydrat	<i>Merck KGaA</i>
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix	<i>New England Biolabs Inc.</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>AppliChem GmbH</i>
DNA Marker (Quick-Load)	<i>New England Biolabs Inc.</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
ECL-Lösung (SignalFire™)	<i>Cell Signaling Technology</i>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	<i>AppliChem GmbH</i>
Ethanol	<i>Merck KGaA</i>
Filterpapier für Western Blot	<i>GE Healthcare Europe GmbH</i>
Gel Extraktion Kit (QIAquick)	<i>QIAGEN</i>
GelRed	<i>Biotium</i>
Geneticin (G418) Disulfat	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
Glasperlen (ø 0.5 mm)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Glukose	<i>Merck KGaA</i>
Glycerin	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Guanin	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
HA-beads (EZview Red Anti-HA Affinity Gel)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Hefeextrakt	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Laktat	<i>AppliChem GmbH</i>
Lithiumacetat-Dihydrat	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Magnesiumchloridhexahydrat	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Milchpulver	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Mini-Präparations Kit (Plasmid Extraktion)	<i>QIAGEN</i>
Natriumchlorid	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (SDS)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Nitrozellulosemembran	<i>Amersham</i>
NG310	<i>Anatrace</i>
Nourseothricin (clonNAT)	<i>WERNER BioAgents</i>
Oligonukleotide (Primer)	<i>metabion international AG</i>

Pepton (Bacto™)	<i>Becton, Dickinson and Company</i>
Phusion high-fidelity DNA polymerase	<i>New England Biolabs Inc.</i>
Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Plasmid Mini und Midi Präparation Kit	<i>QIAGEN</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
p-Nitrophenylphosphatdinatrium (p-NPP)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Polyethylenglykol (PEG 4000)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Ponceau S	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Proteaseinhibitor (cOmplete™)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Kaliumchlorid	<i>AppliChem GmbH</i>
Protein-Leiter (<i>PageRuler Prestained</i>)	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
Rapamycin	<i>LC Laboratories</i>
Restriktionsendonuklease	<i>New England Biolabs Inc.</i>
RNase A	<i>AppliChem GmbH</i>
Saccharose	<i>Merck KGaA</i>
Stripping Buffer	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Träger-DNA (Lachssperma-DNA)	<i>Clontech Laboratories, Inc.</i>
TEMED	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (Tris)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Trypton	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Tween 20	<i>Merck KGaA</i>
Uracil	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Yeast extract	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Yeast nitrogen base (ohne Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)	<i>ForMedium™</i>
Yeast nitrogen base (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>
Zinksulfatheptahydrat	<i>Sigma-Aldrich Co. LLC</i>

2.2 Geräteliste

Gerät	Firma
Autoklav VX-95	<i>Systemec GmbH, Wetzlar</i>
Zentrifugen	
Zentrifuge 5424	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Zentrifuge 5415 R	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Allegra X-15R	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>
Avanti JXN-26	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>

Elektrophorese Ausstattung

Gelelektrophoresekammer, Glasplatten,
Spacer und Gel-Kämme
Stromquelle EV 265

*P. Reiser GmbH, München
Consort bvba, Turnhout, Belgien*

Gel Dokumentation

ChemiDoc™ MP
Fusion™

*Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen*

Inkubatoren

Inkubationsschüttler Ecotron
Inkubationsschüttler Multitron Standard

*Infors AG, Bottmingen/Basel, Schweiz
Infors AG, Bottmingen/Basel, Schweiz*

Heizblock/-schüttler

Thermomixer comfort
DTS-2 Plattenschüttler

*Eppendorf AG, Hamburg
neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs
GmbH, Heidelberg*

Magnetrührer

MR Hei-Tec

Heidolph Instruments GmbH, Schwabach

pH Meter

Microprocessor pH meter, pH 211

Hanna instruments, Vöhringen

Photometer

UVmini-1240
NanoDrop ND-1000
Microplate Reader Infinite® 200 PRO

*Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz*

Schüttler

Orbitalschüttler 410 x 297 mm

*neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs
GmbH, Heidelberg*

Thermocycler

peqSTAR 96 Universal Gradient

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Vortexer und Homogenisator

Vortex-Genie 2
Precellys® 24 Homogenisator

*Scientific Industries, Inc., New York, USA
PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen*

Western Blot Ausstattung

Transferzelle

*Trans-Blot SD semi-Dry, Bio-Rad
Laboratories GmbH, München*

2.3 Kulturmedien

Kulturvierungsmedien für *Escherichia coli*

LB Medium

- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 1% (w/v) Trypton
- 1% (w/v) Natriumchlorid

LB_{Amp} Medium

- LB Medium
- 100 µg/ml Ampicillin (Zugabe nach dem Autoklavieren)

Kulturvierungsmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD Medium

- 1% (w/v) Hefeextrakt
- 2% (w/v) Pepton
- 2% (w/v) Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)

YPD_{G418} Medium

- YPD Medium
- 200 µg/ml Geneticin (G418, Zugabe nach dem Autoklavieren)

YPG Medium

- 1% (w/v) Hefeextrakt
- 2% (w/v) Pepton
- 2% (w/v) Glycerin
- 0,05-0,1% (w/v) Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)

Selektionsmedium

- 0,67 (w/v) Yeast nitrogen base (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)
- auxotrophische Selektion:** Aminosäuren Drop out supplement
- SD Medium:** 2% (w/v) Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)
- SG Medium:** 2% (w/v) Glycerin
- 0,1% (w/v) Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)
- SL Medium:** 2% (w/v) Laktat
- 0,1% (w/v) Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)

Nährstoffmangel-Medium

- 0,17% (w/v) Yeast nitrogen base (ohne Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)
- SD-N Medium:** 2% (w/v) Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)
- pH 5,8

Die Kulturmedien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Die Herstellung von Kulturplatten erfolgte durch Zugabe von 2% (w/v) Agar zum Medium vor dem Autoklavieren.

2.4 Stämme

Für die Deletion eines Gens wurden Stämme aus der Hefe „knockout“ Kollektion von EUROSCARF (BY4742; *MAT α* ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*) verwendet. In bestimmten Fällen wurde für die Deletion eines Gens oder für Mehrfachdeletion die PCR-basierende Gendeletionsstrategie (Kapitel 2.8.5) eingesetzt.

Stammbezeichnung	Genotyp	Referenz
WT (BY4742)	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1998)
WT+ pRS316	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0 [pRS316]</i>	Matthias Müller, AG Reichert
WT + HA-Fzo1	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0 [pRS316-HA-Fzo1]</i>	Diese Arbeit
Δ atg1	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg1::uptag-kanMX4-downntag</i>	Euroscarf ¹
Δ atg1 + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg1::uptag-kanMX4-downntag [pRS316-mtDHFR-GFP]</i>	Diese Arbeit
Δ atg1 + GFP-Atg8	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg1::uptag-kanMX4-downntag [pRS313-GFP-Atg8]</i>	Diese Arbeit
Δ atg1 + Rpl25-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg1::uptag-kanMX4-downntag [pRS316-Rpl25-GFP]</i>	Diese Arbeit
Δ atg1 + Rps2-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg1::uptag-kanMX4-downntag [pRS316-Rps2-GFP]</i>	Diese Arbeit
Δ atg1 + Sec63-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg1::uptag-kanMX4-downntag [pRS316-Sec63-GFP]</i>	Diese Arbeit
Δ atg32	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg32::uptag-kanMX4-downntag</i>	Euroscarf ¹
Δ atg32 + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg32::uptag-kanMX4-downntag [pRS316-mtDHFR-GFP]</i>	Diese Arbeit
Δ atg32 + GFP-Atg8	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg32::uptag-kanMX4-downntag [pRS313-GFP-Atg8]</i>	Diese Arbeit
Δ atg32 Δ pho8 + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 atg32::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP [pRS316-mtDHFR-GFP]</i>	Diese Arbeit
Δ bre5	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 bre5::uptag-kanMX4-downntag</i>	Euroscarf ¹
Δ bre5 Δ pho8 + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 bre5::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP [pYX242mtALP]</i>	Diese Arbeit

<i>Δbre5 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 bre5::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δbre5 Δubp3 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 bre5::uptag-kanMX4-downtag ubp3::loxPhis3MX-loxP pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δbre5 Δubp3 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 bre5::uptag-kanMX4-downtag ubp3::loxPhis3MX-loxP pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8</i> + mtALP + pRS316	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8</i> + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pRS316-mtDHFR-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + pRS316	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316-HA-Fzo1]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1 ^{K398R}	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316- HA-Fzo1 ^{K398R}]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1 ^{K464R}	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316- HA-Fzo1 ^{K464R}]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1 ^{K398R_K464R}	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316- HA-Fzo1 ^{K398R_K464R}]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1-Ubp7	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316- HA-Fzo1-Ubp7]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1-Ubp7	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316- HA-Fzo1-Ubp7]	Diese Arbeit

<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtALP + Fzo1-Ubp7 ^{C618S}	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS316- HA-Fzo1- Ubp7 ^{C618S}]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δdnm1 Δpho8 Δfzo1</i> + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 dnm1::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP fzo1::loxPhis3MX-loxP</i> [pRS316-mtDHFR-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242-mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242-cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242-mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δpho8</i> + mtALP + pRS416	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242-mtALP] [pRS416]	Diese Arbeit
<i>Δpho8</i> + cytALP + pRS416	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242-cytALP] [pRS416]	Diese Arbeit
<i>Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242-cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi1</i>	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::uptag-kanMX4-downntag</i>	Euroscarf ¹
<i>Δubi1</i>	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::loxPhis3MX-loxP</i>	Diese Arbeit
<i>Δubi1</i> + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-mtDHFR-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi1</i> + GFP-Atg8	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS313-GFP-Atg8]	Diese Arbeit
<i>Δubi1</i> + Rpl25-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Rpl25-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi1</i> + Rps2-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Rps2-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi1</i> + Sec63-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Sec63-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi1 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::loxPhis3MX-loxP pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi1 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi1::loxPhis3MX-loxP pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi2</i>	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag</i>	Euroscarf ¹
<i>Δubi2</i> + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-mtDHFR-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi2</i> + GFP-Atg8	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS313-GFP-Atg8]	Diese Arbeit
<i>Δubi2</i> + Rpl25-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Rpl25-GFP]	Diese Arbeit

<i>Δubi2</i> + Rps2-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Rps2-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi2</i> + Sec63-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Sec63-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi2 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi2 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi2::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4</i>	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i>	Euroscarf ¹
<i>Δubi4</i> + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-mtDHFR-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δatg32</i> + mtDHFR-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag atg32::losPhis3MX-loxP</i> [pRS316-mtDHFR-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4</i> + GFP-Atg8	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS313-GFP-Atg8]	Diese Arbeit
<i>Δubi4</i> + Rpl25-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Rpl25-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4</i> + Rps2-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Rps2-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4</i> + Sec63-GFP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-Sec63-GFP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4</i> + HA-Fzo1	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag</i> [pRS316-HA-Fzo1]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + pRS416	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS416]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + Ubi4	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pRS416-Ubi4]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + pRS416	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pRS416]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + Ubi4	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pRS416-Ubi4]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + pKT10	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pKT10]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + WT Ub	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pKT10-WT ubiquitin]	Diese Arbeit

<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + UbK48R	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pKT10-UbK48R]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + UbK63R	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pKT10-UbK63R]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + mtALP + UbK48RK63R	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242mtALP] [pKT10-UbK48RK63R]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + pKT10	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pKT10]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + WT Ub	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pKT10-WT ubiquitin]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + UbK48R	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pKT10-UbK48R]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + UbK63R	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pKT10-UbK63R]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δpho8</i> + cytALP + UbK48RK63R	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> [pYX242cytALP] [pKT10-UbK48RK63R]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δubp3 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> <i>ubp3::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δubi4 Δubp3 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubi4::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPhis3MX-loxP</i> <i>ubp3::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δubp3</i>	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag</i>	Euroscarf ¹
<i>Δubp3</i> + HA-Fzo1	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag</i> [pRS316-HA-Fzo1]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + mtALP + pRS315	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pVT100UmtALP] [pRS315]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + mtALP + Ubp3	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pVT100UmtALP] [pRS315-Ubp3]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + mtALP + Ubp3 ^{C469A}	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pVT100UmtALP] [pRS315-Ubp3 ^{C469A}]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + cytALP + pRS315	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pVT100UcytALP] [pRS315]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + cytALP + Ubp3	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downtag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pVT100UcytALP] [pRS315-Ubp3]	Diese Arbeit

<i>Δubp3 Δpho8</i> + cytALP + Ubp3 ^{C469A}	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pVT100UcytALP] [pRS315-Ubp3 ^{C469A}]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downntag pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δbre5 Δpho8</i> + mtALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downntag bre5::loxPhis3MX-loxP pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242mtALP]	Diese Arbeit
<i>Δubp3 Δbre5 Δpho8</i> + cytALP	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 ubp3::uptag-kanMX4-downntag bre5::loxPhis3MX-loxP pho8::loxPnatMX-loxP</i> [pYX242cytALP]	Diese Arbeit

Tabelle 1: Stammsammlung

2.5 Primer

Bezeichnung	Sequenz
UBI4-P1	TTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTGACGGTATCGATATACTAATTGAGAT CCTGGAGG
UBI4-P2	CGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGACATCACCCTCC ATATGCC

Tabelle 2: Primer für die Plasmid-Generierung

Bezeichnung	Sequenz
PHO8-KO1	TCGTGCTCCACATTTTGCCAGCAAGTGGCACATAAACATTTACACGTACGCTGC AGGTGAC
PHO8-KO2	TGCACTCCGAAACGAAATGCGATACAGTACGTGTCATGCGGTTAGATCGATGA ATTCGAGCTC
UBP3-KO1	GTAGAAGGAATACGTATATAGGTGAACGGTAATAAGAGGGCGTACGCTGCAG GTCGAC
UBP3-KO2	TTTAAAATCGTGCTCACTATCGTATTGTATTGTATTGTATATCGATGAATTCGAG CTC
BRE5-KO1	ACAGAGAATCTGTTGAAAACCTATTTTACTGATACATCTTCGTACGCTGCAGGT CGAC
BRE5-KO2	ATCCCTTCCGCGCCAGTATATTAGTTACTAATCATAACAGATCGATGAATTCGA GCTC
UBI4-KO1	CTGCTTATCTTTCTTCCGAAAGTGCTACTTCAGAAAGCGTACGCTGCAGGTC GAC
UBI4-KO2	GTTGAACAATTTATTTAGTGTCTATGGAGTATTTATCAAATCGATGAATTCGA GCTC
UBI1-KO1	TATTACCGCTTATTATCCCATAGTTGAGACGACCAAGATTCAAACCGTACGCTG CAGGTGAC

UBI1-KO2	AAAGTATACAGTAAATAAATGTATAGATTGATTGGGCGAAACAGAATCGATGA ATTCGAGCTC
UBI2-KO1	CACTTTTCCCGTTCAGCAAGAGGTAAAGCCACCAAAGGTTCAAACGTACGCTG CAGGTCGAC
UBI2-KO2	ATTTGTGGAGATCGTAATAAATCGATTATTTCAACTTCTTCTTTGATCGATGAAT TCGAGCTC
FZO1-KO1	TATCTGATATCACGGATAGAGGCAAAACGGTAGGCTCATTTAACGCGTACGCT GCAGGTCGAC
FZO1-KO2	TTATGTATATTGATTTGAAAAGACCTCATATATTTACAAGAATATATCGATGAAT TCGAGCTC

Tabelle 3: Primer für die Herstellung von Gendelektionskassetten

Bezeichnung	Sequenz
UBI4-A1	TTATTCGCGCAGGGCAACC
UBI4-A4	ACATCACCCTCCATATGCC
UBI1-A1	CGATCAACTCTATCCAACAATT
UBI1-A4	GGATGTCCAGATGCCTAAAG
UBI2-A1	GGTTGTGTTCTTCAATGATGG
UBI2-A4	GAACCAATGGAAAGTCTAAGAT
FZO1-A1	GGAGTTTGTGTCGTTTTTAC
FZO1-A4	GTTGTCTTTTAAATGGAGTTTAAT

Tabelle 4: Primer für die Verifikation der Gendelektion

2.6 Plasmide

Name	Merkmale	Referenz
pYX242 mtALP	2 μ , TPI, LEU2	(Mendl et al, 2011)
pYX242 cytALP	2 μ , TPI, LEU2	(Mendl et al, 2011)
pVT100U mtALP	CEN, URA3	(Mendl et al, 2011)
pVT100U cytALP	CEN, URA3	(Mendl et al, 2011)
pRS416	CEN, URA3, Leervektor	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS416-Ubi4	CEN, URA3	Diese Arbeit
pRS316-Rpl25-GFP	CEN, URA3	(Gadal et al, 2001)
pJK59	CEN, URA3, kodiert Sec63-eGFP	(Prinz et al, 2000)
pRS316-Rps2-GFP	CEN, URA3	(Milkereit et al, 2003)
pRS315	CEN, LEU2	(Kraft et al, 2008)
pRS315-Ubp3	CEN, LEU2	(Kraft et al, 2008)
pRS315-Ubp3_C469A	CEN, LEU2	(Cebollero et al, 2012)
pKT10	CEN, URA3, Leervektor	(Saeki et al, 2009)
pOKA601	pKT10 mit Wildtyp Ubiquitin	(Saeki et al, 2009)
pOKA602	pKT10 mit Ubiquitin mutiert bei K48	(Saeki et al, 2009)

pOKA603	pKT10 mit Ubiquitin mutiert bei K63	(Saeki et al, 2009)
pOKA604	pKT10 mit Ubiquitin mutiert bei K48 und K63	(Saeki et al, 2009)
pRS313-GFP-Atg8	CEN, HIS3	(Mendl et al, 2011)
mtDHFR-GFP	pRS316-Su9-mtDHFR-GFP, CEN, URA3	Prof. Dr. Thumm
pHS12-mitoDsRED	CEN, LEU2	(Mendl et al, 2011)
pRS316	CEN, URA3, Leervektor	(Anton et al, 2013)
pRS316-HA-Fzo1	CEN, URA3	(Anton et al, 2013)
pRS316-HA-Fzo1-Ubp7	CEN, URA3	(Anton et al, 2013)
pRS316-HA-Fzo1-Ubp7C618S	CEN, URA3	(Anton et al, 2013)
pRS316-HA-Fzo1-K398R	CEN, URA3	(Anton et al, 2013)
pRS316-HA-Fzo1-K398R_K464R	CEN, URA3	(Anton et al, 2013)

Tabelle 5: Plasmidliste

2.7 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden in Milchpulver-Lösung (5% (v/w) Milchpulver in 1 x TBST) verdünnt und für die Mehrfachverwendung bei -20°C gelagert.

Name	Merkmale	Firma/Referenz
1. Antikörper		
α Ape1	Polyklonales Antiserum, Kaninchen 1: 500 Verdünnung	Klionsky <i>et al.</i> , 1992
α Atg32	Kaninchen 1:500 Verdünnung	Designt von Pineda, Berlin
α Bmh2	Polyklonales Antiserum, Kaninchen 1: 2000 Verdünnung	AG Walter; 03.03.1996 München
α Fzo1	Polyklonales Antiserum, Kaninchen 1:500 Verdünnung	AG Escobar-Henriques, Köln
α GFP	Polyklonales Antiserum, Maus 1: 1000 Verdünnung	ROCHE, Klonnr. 7.1/13.1
α Pho8	Polyklonales Antiserum, Kaninchen 1: 3000 Verdünnung	AG Reichert; 01.06.2007 München
α Pgk1	Polyklonales Antiserum, Maus 1: 1000 Verdünnung	Abcam, Klonnr. 22C5D8
α Tim44	Polyklonales Antiserum, Kaninchen 1:1000 Verdünnung	Designt von Pineda, Berlin
α Ubiquitin	Polyklonales Antiserum, Maus 1:1000 Verdünnung	Merck Millipore, Klonnr. P4D1-A11
α Ubp3	Kaninchen 1:500 Verdünnung	Designt von Pineda, Berlin

Tabelle 6: erst Antikörperliste

2. Antikörper		
α Maus	1:10000 Verdünnung	Abcam, Nr. ab97023
α Kaninchen	1:10000 Verdünnung	Nr. DAB-87745, Dianova, Hamburg

Tabelle 7: zweit Antikörperliste

Anti-Ubp3 Antikörper

Für die Detektion des endogenen Ubp3 Proteins wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper gegen NH₂-CKQFDKETYKFLFNADD-CONH₂ (Pineda, Deutschland) verwendet.

Anti-Atg32 Antikörper

Für die Detektion des endogenen Atg32 Proteins wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper gegen NH₂-QREGKGSSSKSMPPDSSSTTIHTC-CONH₂ (Pineda, Deutschland) verwendet.

2.8 Methoden in der Hefegenetik

2.8.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung der Hefe erfolgte nach Standardmethoden bei 30 °C (Sherman, 2002). Für die Kultivierung in flüssigem Medium wurden die Stämme in Kolben bei 200 rpm in einem Inkubationsschüttler (Ecotron, Infors) herangezogen. Stämme, die kein Plasmid enthalten, wurden in nährstoffreichem Medium (YPD) und Stämme mit Plasmiden, die über einen Auxotrophie-Marker (Kapitel 2.3) verfügen, wurden im entsprechenden Selektionsmedium kultiviert. Erforderte die Kultivierung respiratorische Verhältnisse wurde Medium mit einer nicht-fermentativer Kohlenstoffquelle, Glycerin (SG Medium) oder Laktat (SL Medium), verwendet. Für ein fermentatives Wachstum wurde glukosehaltiges Medium (SD Medium) eingesetzt. Die langfristige Aufbewahrung der Stämme erfolgte in 20%igen (v/v) Glycerin-Stock bei -80 °C.

2.8.2 Transformation von *S. cerevisiae* mit DNA

Für die Transformation wurden Hefestämme über Nacht bei 30 °C im jeweiligen fermentativen Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ ~ 0,25 mit frischen

Medium verdünnt. Die Stämme wurden in der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert bis zum Erreichen einer $OD_{600} \sim 0,5 - 1,0$ (Photometer UVmini-1240, Shimadzu). Anschließend wurden 10 ml Kultur pro Transformationsansatz geerntet und bei $3.500 \times g$ für 3 Minuten zentrifugiert (Allegra X-15R, Beckmann). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 500 μ l sterilem 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei $4.600 \times g$ für 30 Sekunden zentrifugiert (Zentrifuge 5424, Beckmann) und der Überstand verworfen. Auf das Zellpellet wurde 240 μ l steriles 50% (w/v) Polyethylenglykol (PEG 4000), 36 μ l steriles 1 M Lithiumacetat, 5 μ l denaturierte 10 mg/ml Lachssperma-DNA, die Transformations-DNA ($\sim 0,5 \mu$ g) und steriles Wasser (80 μ l - xx μ l Transformations-DNA) gegeben. Durch vortexen für 1 Minute (Vortexer, Scientific Industries) wurde der Ansatz gemischt und dann für 0,5 Stunden bei 30 °C inkubiert (Thermomixer, Eppendorf). Danach wurden erhalten die Zellen einen Hitzeschock bei 42 °C für 20 Minuten. Der Transformations-Mix wurde nach Ablauf des Hitzeschocks für 15 Sekunden bei $13.000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 s bei $13.000 \times g$ wurde das Gemisch in 1 ml YPD resuspendiert und bei 30°C für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert, auf Agarplatten ausgestrichen und für ungefähr drei Tage kultiviert, um einzelne Kolonien zu selektionieren.

2.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung der DNA erfolgte wie zuvor beschrieben (Robzyk & Kassir, 1992). Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht bei 30°C in Selektionsmedium kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 1,5 ml der Kultur bei 3.500 rpm für 3 min zentrifugiert, mit 500 μ l Wasser gewaschen und anschließend 100 μ l in STET-Puffer (8% Sucrose; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 5% Triton X-100) resuspendiert. Anschließend wurden 0,2 g Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) zugegeben und für 15 sec bei 5.000 rpm im Precellys gevortext. Nach pelletieren der Zellen wurden weitere 100 μ l STET-Puffer zugegeben und kurz gevortext. Die Mixtur wurde dann für 3 min bei 99°C auf dem Heizblock erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4°C wurde der 100 μ l Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zum Überstand wurde auf Eis 50 μ l kaltes 7,5 M Ammoniumacetat zugefügt und für 1 Stunde gefällt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gemisch für 10 min bei

13.000 rpm, 4°C zentrifugiert und 100 µl des Überstands mit 200 µl eiskaltem 100% Ethanol in ein neues Tube überführt. Die DNA wurde durch zentrifugieren für 10 min bei 13.000 rpm, 4°C pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die gereinigte DNA wurde durch abdampfen des Alkohols getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

2.8.4 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* für PCR-basierende Applikation

Der Hefestamm wurde über Nacht in YPD Medium kultiviert und am nächsten Tag wurden 100 µl (OD₆₀₀= 0,4) Zellen geerntet. Die Suspension wurde für 3 min bei 3.500 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl 200 mM Lithiumacetat + 1% SDS resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch kurz gevortext und für 5 min bei 70°C im Heizblock inkubiert. Dann wurden 300 µl 100% Ethanol zugefügt und erneut gevortext, um die DNA zu fällen. Durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 3 min wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser gelöst. Durch erneute Zentrifugation (15.000 g, 15 sec, RT) wurde die DNA von Zellresten befreit.

2.8.5 Gendeletion in *S. cerevisiae*

Die Durchführung der Deletion eines Genes erfolgte wie zuvor beschrieben (Baudin et al, 1993). Das entsprechende Gen wurde durch Homologe Rekombination durch eine wählbare Markerkassette ausgetauscht. Die Kassette wurde durch Amplifikation des Markergens von einem entsprechenden Plasmid durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert. Die zwei verwendeten Primeroligonukleotide verfügten über eine zusätzliche Sequenz, die 45 bp homolog zum 5'- bzw. 3'-Ende des Zielgenes war. Dabei wurden die Bereiche so gewählt, dass sie 100 bp vor dem Startcodon und 50 bp nach dem Stopcodon des Gens liegen. Dies sollte eine effiziente Deletion der Promotor- und Terminator-Region gewährleisten. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Die designte Kassette wurde durch Transformation (Kapitel 2.8.2) in den entsprechenden Stamm integriert. Die anschließende Ausplattierung auf Selektionsmedium (Agar-Platten) führte zur Isolation von Kolonien mit integriertem Selektionsmarker. Die erfolgreiche Gendeletion wurde im

Anschluss durch PCR und wenn möglich durch Western Blot Analyse mit entsprechendem Antikörper verifiziert.

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 ALP Assay zur quantitativen Bestimmung der Mitophagie- bzw. Autophagieaktivität

Für die quantitative Ermittlung der Aktivität an Mitophagie oder nicht-selektiver Autophagie musste zuvor *PHO8* im entsprechenden Hefestamm deletiert werden und mit einem Plasmid, das für mtALP bzw. cytALP kodiert, transformiert werden. Die Analyse der Aktivität erfolgte gemäß nach Mendl *et al.*, (2011). Die Kultivierung erfolgte in Glaskolben unter respiratorischen Bedingungen. Die Hefestämme wurden für mindestens 3 Tage in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden mit 1 μ M Rapamycin behandelt oder wurden unbehandelt gelassen. Für die ‚nitrogen-starvation‘ Induktion der Mitophagie bzw. nicht-selektiven Autophagie wurden die Zellen nach entsprechender Kultivierungszeit in ein glukosehaltiges Stickstoffmangelmedium (SD-N) überführt und für 0, 5 oder 24 Stunden weiter kultiviert. Bei der ‚stationary phase‘ induzierten Mitophagie bzw. nicht-selektiven Autophagie wurden die Zellen bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert. In Folge dessen wurde die optische Dichte (OD_{600}) der behandelten bzw. unbehandelten Hefekulturen bestimmt und 4 OD_{600} durch Zentrifugation (3.500 x g für 3 min, RT) geerntet. Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem Wasch-Puffer (0,2 mM PMSF-Lösung) resuspendiert, zentrifugiert (35 sec, 17.000 x g, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Generierung der Gesamtproteinextraktion werden die Zellen in 200 μ l Lysis-Puffer gelöst. Zur Suspension wurden 0,25 g \pm 0,005 g Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) zugegeben und für 10 s bei 5000 rpm im Homogenisator (24 Precellys, PEQLAB) lysiert. Nach Zugabe von weiteren 100 μ l Lysis-Puffer, zur Erhöhung der Volumens, wurde das Zelllysate zentrifugiert (12.000 x g, 5 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Tube überführt. Die Analyse der spezifischen alkalischen Phosphatase (ALP)- Aktivität (mtALP bzw. cytALP) und der Proteinkonzentration erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, die auf Eis kühl gelagert wurden.

Lysis-Puffer

10 mM	MgCl ₂
0,1 M	KOAc
50 mM	KCl
10 µM	ZnSO ₄
20 mM	PIPES pH 7,0
0,5% (v/v)	Triton X-100
1 mM	PMSF

Alkalischen Phosphatase Aktivität

5 µl Lysat wurde viermal in je eine Vertiefung der Titerplatte pipettiert und eine Probe (Blindwert) zusätzlich mit 125 µl Stop-Puffer (2 M Glycin) vermischt. Zu allen 4 Proben wurde 120 µl Reaktions-Puffer gegeben und bei 37°C für 15 min inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden zu den restlichen 3 Vertiefungen ebenfalls 125 µl Stop-Puffer gegeben, um die Reaktion zu beenden. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm.

Reaktions-Puffer

40 mM	MgCl ₂
0,5% (v/v)	Triton X-100
0,25 M	Tris-HCl pH 8,5
4 mM	p-Nitrophenylphosphat

Proteinkonzentration

Die Ermittlung der Proteinkonzentration der Gesamtzellextrakte erfolgte mit dem BCA-Proteinassay (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben für mindestens dreimal. Hierfür wurden 3 x 20 µl Zelllysat mit je 200 µl BCA-Reagenz gemischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Zusätzlich wurde aus einem BSA-Standard (2 mg/ml) eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 562 nm.

Die spezifische ALP-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \text{spezifische ALP - Aktivität} &= \frac{\text{ALP - Aktivität}}{\text{Proteinkonzentration}} \\ &= \frac{(A_{t=15 \text{ min}}^{\text{ALP } 405 \text{ nm}} - A_{t=0 \text{ min}}^{\text{ALP } 405 \text{ nm}})}{t \times d \times \varepsilon_{p\text{-NPP}} \times c_{\text{Protein}}} \times \text{Verdünnung} \end{aligned}$$

$A_{t=15 \text{ min}}^{\text{ALP}}$

Absorption gemessen bei 405 nm

$A_{t=0 \text{ min}}^{ALP}$	Absorption der Blindprobe gemessen bei 405 nm
t	Inkubationszeit bei 37 °C (15 min)
d	Lichtweg durch die Probe (bei 250 µl entspricht das 0,57 cm)
ϵ_{p-NPP}	Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenylphosphat (18.000/M x cm)
Verdünnung	50 x
$C_{Protein}$	Proteinkonzentration

2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der Gelelektrophorese wurde verwendet, um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Proben mit der gleichen Proteinmenge wurden mit SDS-Ladepuffer (2% (w/v) SDS; 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 0.08% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und anschließend bei 95°C für 5 min im Heizblock denaturiert. Die denaturierten Proben wurden auf ein 8-12% SDS-Gel geladen, abhängig vom Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins. Für die Beurteilung des Molekulargewichts wurde zusätzlich ein Proteinmarker (PageRuler Prestained, Thermo Fisher) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in Laufpuffer in einer 2 stufigen Methode (1. Schritt 25 mA für 20 min; 2. Schritt 40 mA für 3-4 h) durchgeführt.

Laufpuffer

380 mM	Glycin
50 mM	Tris-HCl pH 8.3
0,1% (w/v)	SDS

Sammelgel

5% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid
0,1 % (w/v)	SDS
60 mM	Tris-HCl pH 6,8
0,1% (v/v)	APS
0,1% (v/v)	TEMED

Trenngel

8 - 12% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid
0,1% (w/v)	SDS
375 mM	Tris-HCl pH 8,8
0,08% (w/v)	APS
0,08% (v/v)	TEMED

2.9.3 Western Blot

Die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran durch Verwendung einer Transferzelle (Trans-Blot SD semi-Dry, Bio-Rad) übertragen. Hierfür wurden 3 Schichten in Blotting-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% Ethanol; 0,08% SDS) getränktes Filterpapier auf das Blotting System, das mit der Anode verbunden war, platziert. Darauf wurde das Gel und schließlich in Puffer getränkte Nitrozellulosemembran gegeben. Zuletzt wurden weitere 3 Lagen Filterpapier gelegt. Die Apparatur wurde durch Auflegen der Kathode geschlossen. Die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran wurde bei 200 mA für 60-150 min (abhängig von der Proteingröße) durchgeführt. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde durch anfärben mit Ponceau S verifiziert.

2.9.4 Immunologische Detektion von Proteinen

Für die Detektion der auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine wurden zuerst unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in Milchpulver-Lösung (5% (w/v) Milchpulver in 1 x TBST) für 1 Stunde blockiert. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1 x TBST für 5 min gewaschen, für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Zweitantikörper behandelt und erneut dreimal mit 1 x TBST gewaschen. Durch die Antikörperbehandlung wurde an das Zielprotein eine Meerrettich-Peroxidase gebunden. Die Aktivität der Peroxidase konnte mittels Chemilumineszenz (ECL) detektiert werden. Hierfür wurde auf die Membran eine ECL-Lösung (SignalFire™, Cell Signaling Technology) gegeben und die Reaktion mittels Geldokumentationssystem (ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad bzw. Fusion™, PEQLAB) detektiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 und 7 aufgeführt.

2.9.5 HA-Immunopräzipitation für die Analyse der Ubiquitinierung von Fzo1

Die entsprechenden Zellen wurden für mindestens drei Generationen in SG-Medium kultiviert und anschließend 140 OD₆₀₀ geerntet. Die pelletierten Zellen wurden in 300 µl TBS (1 M, 4°C) resuspendiert, 900 mg Glasperlen (ø 0,5 mm), 10 µl PMSF (200mM PMSF in Isopropanol) und

40 µl Proteaseinhibitor (cOmplete™, Sigma-Aldrich, 1 Tablette in 2 ml Wasser gelöst = 25x) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen wie folgt aufgeschlossen:

- 30 s vortexen
- 15 s Eis
- 30 s vortexen
- 15 s auf Eis
- 30 s vortexen
- 15 s auf Eis
- 45 s vortexen
- 30 s auf Eis

Zu den homogenisierten Zellen wurde 350 µl TBS gegeben und bei 400 rpm für 2 Minuten, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppi überführt und bei 13200 rpm für 15 min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet (Mitochondrien) wurde in 500 µl 0,2% NG310 (von Anatrace) in TBS gelöst und für 1 Stunde im Kühlraum rotiert. In der Zwischenzeit wurde ein frisches Eppi mit 500 µl 0,2% NG310 in TBS + 25 µl HA-Beads (anti-HA beads EZ view von Sigma) + 40 µl Proteaseinhibitor vorbereitet. Nach Ablauf der Zeit wurde das gelöste Pellet für 5 min, 13200 rpm, 4°C zentrifugiert. 40 µl Überstand wurden für den Input mit 40 µl 2 x Probenpuffer (4% SDS; Glycerin 20%; 0,135 M Tris-HCl pH 6,8; DTT 100 mM frisch hinzugegeben) gemischt. Der restliche Überstand (460 µl) wurde zum vorbereiteten Eppi mit den HA-Beads gegeben und über Nacht im Kühlraum rotiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch für 30 s bei 2000 rpm, 4°C zentrifugiert und dreimal mit 0,2% NG310 in TBS gewaschen. Jeglicher Überstand wurde abgenommen, 60 µl 2X Probenpuffer zu den Beads gegeben und für 20 Minuten bei 1400 rpm, 40°C geschüttelt. 50% des Inputs bzw. der IPs wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.9.2) und Western Blot (Kapitel 2.9.3 und 2.9.4) analysiert.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion in einem Thermocycler (PEQLAB) durchgeführt (Saiki et al, 1988). Für den PCR-Reaktionsansatz wurde 1 U der thermostabilen DNA-Polymerase (*Phusion high-fidelity DNA polymerase*, New England Biolabs Inc.), HF-Puffer (New England Biolabs Inc.), 200 µM Desoxyribonukleosid-triphosphat-Lösung (dNTP, New England Biolabs Inc.), 100 - 500 ng genomische DNA als

Matrize und 10 pmol von zwei Primern gemischt. Die PCR-Reaktion erfolgte durch eine Reihe von automatischen Temperaturänderungen (Zyklen). Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA für 5 min bei 98 ° C denaturiert. Die DNA wurde in insgesamt 40 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus: 1.) Denaturierung der DNA bei 95°C für 1 min, 2.) Bindung der Primer bei 55-60°C (abhängig von der Primerlänge und –zusammensetzung) für 1 min und 3.) Amplifikation der DNA durch die Polymerase bei 72°C für 0,5-3 min (abhängig von der Matrize). Am Ende erfolgte ein zusätzlicher Schritt, in dem für 10 min bei 72°C alle unvollständigen DNA-Fragmente komplementiert wurden. Zur Analyse des enthaltenen PCR-Produktes oder für die Aufreinigung wurde im Anschluss die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen 2-4 aufgelistet.

2.10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse bzw. Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese nach ihrer Größe durch die horizontale Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Abhängig von der Größe des DNA-Fragments wurde eine Agarosekonzentration von 1-2% (w/v) verwendet. Für die Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verdünnt und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Die warme Lösung wurde mit GelRed™ (Fluoreszenzfarbstoff für Nukleotide) versetzt. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer gemischt und auf das erhärtete Gel aufgetragen. Für die Feststellung der DNA-Fragmentgröße wurde ein DNA-Marker (Quick-Load®) eingesetzt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 15 V/cm für 1 Stunde. Die Detektion der fluoreszierenden DNA-Fragmente erfolgte im Geldokumentationssystem (Fusion™, PEQLAB).

2.10.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Für die Isolierung der Proben aus dem Agarosegel nach Ablauf der Gelelektrophorese (Kapitel 2.10.2) erfolgte durch Ausschneiden der spezifischen fluoreszierenden Bande. Die DNA wurde aus dem Gelstück durch Einsatz eines Gelextraktionskits (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert. Die gereinigte DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser eluiert

und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm im Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) ermittelt.

2.10.4 Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit 1-3 Units der entsprechenden Restriktionsendonukleasen pro Mikrogramm DNA in den vom Hersteller (New England Biolabs Inc., NEB) mitgelieferten Puffer-Systemen. Der Verdau wurde bei 37°C innerhalb 1 bis 2 Stunden durchgeführt. Die entsprechenden Proben konnten mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.10.2) analysiert bzw. Gelextraktion (Kapitel 2.10.3) aufgereinigt werden.

2.10.5 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Für die Generierung kompetenter *E.coli* Zellen wurde aus einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-blue 250 ml Kultur in LB-Medium bis auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,3-0,6 bei 37°C angezogen. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3.000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml eiskalter steriler TSB-Lösung (10% (w/v) Polyethylenglykol (PEG 4,000); 5% (v/v) DMSO; 20 mM MgCl₂; in LB Medium gelöst) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden in Aliquotes zu je 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.6 Transformation of *E. coli* with DNA

Für die Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen mit DNA wurden 50 ng Plasmid DNA oder 10 - 15 µg Hefe-DNA (Kapitel 2.8.4) mit 100 µl chemisch kompetenten Bakterien (Kapitel 2.10.5) vermengt. Das Gemisch wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfuhren die Zellen einen Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Im Anschluss wurde der Ansatz für 5 Minuten auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 0,5 ml LB-Medium zu den Zellen und anschließender Inkubation bei 37°C für 1 Stunde, konnten sich die Bakterien erholen und die DNA replizieren. Zum Schluss wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und die in 100 µl sterilem Wasser gelösten *E.coli* Zellen auf LB_{Amp} Agarplatten ausplattiert. Nach Übernachtsinkubation bei 37°C konnten einzelne Kolonien gepickt werden.

2.10.7 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde mittels Mini- oder Midi-Präparationskit (QIAprep, Spin Miniprep Kit bzw. Spin Midiprep Kit) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.10.8 DNA Sequenzierung

Gereinigte DNA oder PCR Produkte wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) mittels zyklischer Sequenzierungstechnik basierend auf der Kettenterminationsmethode entwickelt durch Sanger, durchgeführt (Sanger et al, 1977).

2.10.9 Klonierungsstrategie

Herstellung von pRS416-Ubi4

Das pRS416-Ubi4 Plasmid wurde mittels PCR Amplifikation (Kapitel 2.10.1) des offenen Leserahmens (engl. „*open reading frame*“) des Gens *UBI4* aus der genomischen DNA des Wildtypstamms BY4742 designt. Der DNA Bereich, der amplifiziert wurde, beinhaltete sowohl etwa 1000 Basenpaare vor dem Startcodon und 500 Basenpaare nach dem Stopcodon, um eine endogene Genexpression zu ermöglichen (Abb.14). Das synthetisierte PCR-Produkt wurde mittels PCR-Purifikation Kit (QIAGEN) auf gereinigt und in den pRS416 Vektor unter Verwendung der Homologen Rekombination inseriert (Ma et al, 1987). Hierbei wurde das pRS416 Plasmid linearisiert durch Restriktionsverdau mit dem *EcoRI* Enzym (Kapitel 2.10.4). Die verwendeten Primer für die PCR-Amplifikation besaßen eine zusätzliche Sequenz von 40 bp homolog zum Ende des linearisierten Vektors. Durch Transformation des linearisierten Vektors und des PCR-Produkts wurde ein zirkuläres Plasmid designt. Das fertige Plasmid wurde aus den Hefezellen extrahiert (Kapitel 2.8.3), mittels *E.coli* Transformation und anschließender Mini-Präparation (Kapitel 2.10.7) aufgereinigt. Die Sequenzierung des Plasmids erfolgte durch eine Fremdfirma (Kapitel 2.10.8).

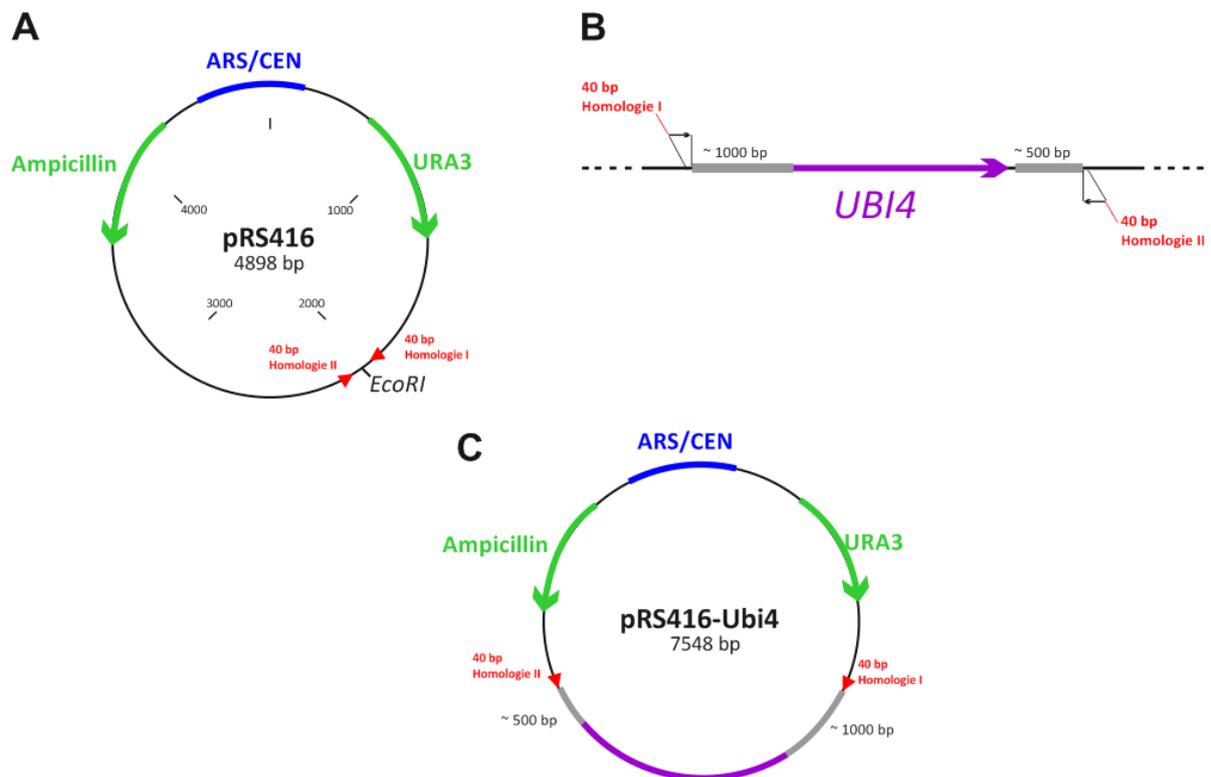


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Herstellung von pRS416-Ubi4. **A**, Der Leervektor pRS416 wurde durch Enzymverdau mit *EcoRI* linearisiert. **B**, *UBI4* wurde inklusive der eigenen Promotor- und Terminatorregion von einer genomischen DNA amplifiziert. Die Primersequenzen enthielten 40 Basenpaare homolog zum freien Ende des linearen Leervektors. **C**, Das zirkuläre Plasmid wurde durch homologe Rekombination bei der Transformation in den Wildtyp Hefestamm designet.

2.11 Zelluläre Fraktionierung

2.11.1 Isolation von Mitochondrien

Die entsprechenden Stämme wurden in SG Selektionsmedium oder YPG Medium (+ 0,1% Glucose) angeimpft und über Nacht bei 120 rpm, 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für mindestens 3 Generationen im gleichen Medium (+ 0,05% Glucose) kultiviert und beim letzten Verdünnungsschritt auf 1 L ($OD_{600} = 0,1$) angeimpft. Diese Hauptkultur wurde über Nacht bei 30 °C, 120 rpm herangezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei einer $OD_{600} = 1-2$ geerntet (5 min, 1500 g, RT). Das Pellet wurde mit 50 ml sterilem Wasser gewaschen, in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1500 g (5 min, RT) zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 50 ml Tris-Puffer (100 mM Tris/ SO_4 , pH = 9,4 und 10 mM DTT) resuspendiert und für 20 min bei 30°C geschüttelt. Nach Zentrifugation (1500 g, 5min, RT)

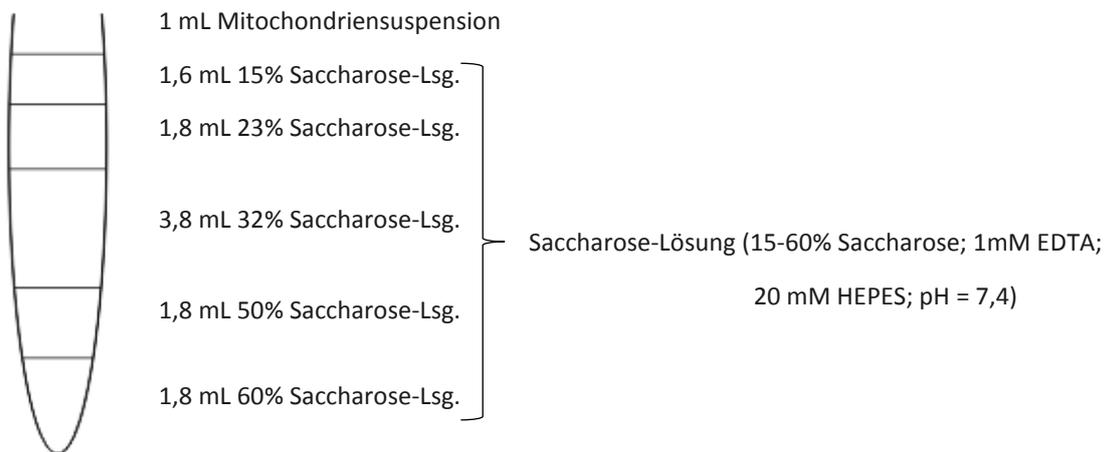
wurden die Zellen mit 1,2 M Sorbitol-Lösung gewaschen, pelletiert (1500 g, 5min, RT) und in Zymolyase-Lösung (1,2 M Sorbitol mit 3mg/ml 20T Zymolyase) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 1 Stunde bei 30°C geschüttelt. Die Spheroblastenbildung wurde kontrolliert, indem 10 µl Zellsuspension in 1 ml Wasser gelöst wurde und anschließend der rapide Verlauf der OD₆₀₀ verfolgt wurde. Bei einer Spheroblastenbildung wurde die Suspension zentrifugiert (1500 g, 5 min, RT) und mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in kalter NMIB (600 mM Sorbitol; 5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 100 mM KOAc; 20 mM HEPES (pH = 7,4); 1 mM PMSF und complete Inhibitor) gelöst und in einen vorgekühlten Douncer gegeben. Durch vorsichtiges douncen (40-mal bei WT, 25 mal bei Mutanten) wurden die Zellen homogenisiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches Falcon überführt und nochmals zentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Mitochondrien bei 10250 g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 mL NMIB resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.11.2 Isolation von Mitochondrien durch Gradientenzentrifugation

Die Hefekultur wurde in SG Selektionsmedium oder YPG Medium (+ 0,1% Glucose) für mindestens 3 Tage kultiviert und beim letzten Schritt auf 1-2 L (OD₆₀₀ = 0,1) im gleichen Medium (+ 0,05% Glucose) verdünnt. Diese Hauptkultur wurde über Nacht bei 30 °C, 120 rpm herangezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ = 1-2 geerntet (5 min, 4000 g, RT). Nachdem das Nassgewicht der Zellen bestimmt wurde, wurden sie in 2 ml DTT-Puffer (10 mM DTT; Tris/SO₄; pH 9,4) pro 1 g Nassgewicht resuspendiert und für 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 4 mL Sorbitolpuffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM KP_i; pH 7,4) gewaschen, im gleichen Volumen an Sorbitolpuffer resuspendiert und mit 6 mg 20T Zymolyase pro 1 g Nassgewicht versetzt. Die Suspension wurde bei 30 °C für etwa 1 Stunde geschüttelt und die Spheroblastenbildung kontrolliert (Kapitel 2.11.1). Die Spheroblasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 1500 g, RT) sedimentiert und vorsichtig in 6 mL eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2% fettsäurefreies BSA; pH 7,4; complete Inhibitor) pro 1 g Nassgewicht gelöst. Die Zellen wurden auf Eis durch 25 maliges Homogenisieren im Douncer aufgeschlossen. Vom Zelltotal wurde ein Aliquot abgenommen. Das Lysat wurde zweimal zentrifugiert (5 min, 2000 g) und der

Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 13000 g, 12 min und 4°C wurde das Zytosol (Aliquot aufgehoben) und unreine Mitochondrien separiert.

Für die Erhöhung der Reinheit der isolierten Mitochondrien wurde eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurden in einem SW41Ti-Zentrifugationsröhrchen (Gesamtvolumen max. 12,89 mL) eine hochmolekulare mit niedermolekularen Saccharose-Lösungen überschichtet. Ein Gradient setzt sich wie folgt zusammen:



Der eisgekühlte Gradient wurde 2 Stunden bei 130000 g und 4 °C zentrifugiert. Von den Anreicherungsfraktionen wurde jeweils ein Aliquot (200 µl) von oben nach unten entnommen. Zwischen der 50%igen und 60%igen Saccharose-Lösung befanden sich die Mitochondrien, die komplett abgenommen wurden und mit der zweifachen Volumenmenge an kaltem HS-Puffer (20 mM HEPES; 0,6 M Sorbitol; pH=7,4) versetzt, zentrifugiert (13000 g, 12 min, 4°C) und in 1 mL HS-Puffer gelöst wurden.

2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop und der dazugehörigen Software gemacht. Es wurde ein Ölimmersionsobjektiv (64x) verwendet. Für die Analyse wurden die Stämme zusätzlich mit pHS12mitoDsRed.T3 transformiert. Das Plasmid kodiert für eine Fusion bestehend aus einem rot fluoreszierenden Protein (DsRed) aus dem Organismus *Discosoma sp.* und eine mitochondriale Lokalisierungssequenz der

Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit VIII (mito). Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden 1 μ l ($OD_{600} = 0,8$) Zellkultur auf einen Objektträger pipettiert und zum Fixieren mit 1 μ l einer 2%igen niedrig schmelzenden Agarose-Lösung gemischt. Das Präparat wurde mit einem Deckglas abgedeckt und die Zellen mikroskopiert.

3 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit analysierte Matthias Müller aus unserer Arbeitsgruppe fast 5000 nicht-essentielle Gene der Bäckerhefe hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Rapamycin-induzierte Mitophagie. Nach Validierung der Ergebnisse und Betrachtung der nicht-selektiven Autophagie wurden 86 positive und 10 negative Regulatoren der Rapamycin-induzierten Mitophagie, inklusive der Proteine Ubp3 und Bre5, identifiziert. In Zusammenarbeit mit Matthias Müller konnten wir demonstrieren, dass Ubp3 und Bre5 an der reziproken Regulation der Mitophagie und der nicht-selektiven Autophagie involviert sind. Darüber hinaus zeigte der Ubp3/Bre5-Dubiquitinase-Komplex einen Einfluss auf die Rapamycin-induzierte 60S Ribophagie und den Cvt-Weg. Diese Daten und Teile der Ergebnisse dieser Arbeit (Kapitel 3.1.3) wurden inzwischen publiziert (Müller et al, 2015).

Aus den Befunden ergaben sich einige offene Fragen, unter anderem ob eine Ubiquitinierung direkt die Mitophagie induziert und in wieweit der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex in die Regulation dieses Prozesses involviert ist. Diese und weitere Punkte sollten im Zuge dieser vorliegenden Arbeit geklärt werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Regulation der selektiven Eliminierung von Mitochondrien.

3.1 Charakterisierung des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes

3.1.1 Die katalytische Aktivität der Deubiquitinase Ubp3 ist essentiell für die Wirkung auf Mito- und Autophagie

Für die Ubiquitin-spezifische Protease Ubp3 konnte kürzlich eine reziproke Regulation der Mitophagie und der nicht-selektiven Autophagie gezeigt werden (Müller et al, 2015). In diesem Zusammenhang sollte zuerst geklärt werden inwieweit die katalytische Aktivität der Deubiquitinase wesentlich für diese zellulären Prozesse ist.

Die Quantifizierung der Aktivität an Mitophagie und nicht-selektiver Autophagie erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase (ALP) gemäß Mendl *et al.* (2011) (Kapitel 2.9.1). Das Verfahren erforderte die Deletion der endogenen alkalischen Phosphatase *PHO8* durch Transformation

einer spezifischen Knockout-Kassette in den $\Delta ubp3$ Stamm und Verifikation mit Hilfe PCR-basierter Analyse (Kapitel 2.8.5). In die entsprechenden Stämme wurde die spezifische Alkalische Phosphatase und ein Plasmid, das Ubp3 unter der Kontrolle des endogenen Promotors, eine katalytisch inaktive Variante von Ubp3 (Ubp3^{C469A}) oder den Leervektor exprimiert, integriert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in SG-Medium für mindestens drei Tage mit anschließender Mitophagie-Induktion durch Rapamycin-Behandlung (1 μ M Rapamycin, 0 oder 24 Stunden).

Durch Expression von Ubp3 wurden sowohl die Zunahme der Mitophagie-Aktivität und die Autophagie-Reduktion in $\Delta ubp3$ kompensiert (Abb. 15 A und B).

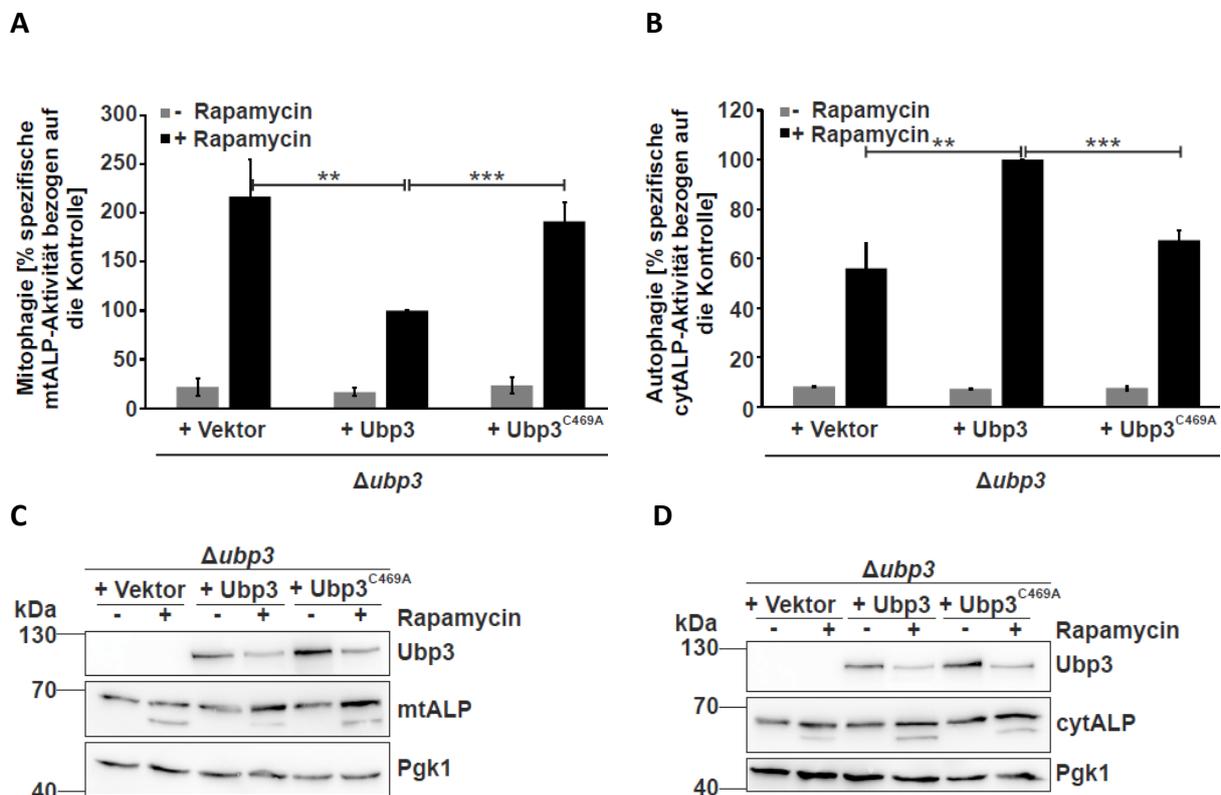


Abbildung 15: Die katalytische Aktivität der Ubiquitin-spezifischen Protease Ubp3 ist essentiell für die Regulation der Mitophagie und der nicht-selektiven Autophagie. A und B, Stämme mit der angegebenen Deletion und endogenem *PHO8* Knockout wurden mit pVT100UmtALP (A) oder pVT100UcytALP (B) und dem Leervektor (pRS315), pRS315-Ubp3 oder pRS315-Ubp3^{C469A} transformiert. Die Stämme wurden für mehrere Generationen in SG-Medium kultiviert und mit Rapamycin (1 μ M, 24 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basiertem Assay bestimmt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung (n \geq 3) normiert auf den komplementierten Stamm ($\Delta ubp3$ + Ubp3) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: p>0,05; *: p \leq 0,05; **: p \leq 0,01; *: p \leq 0,001). C und D, proteolytische Spaltung der mtALP (C) oder cytALP (D) wurde mittels Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Pgk1 diente als Ladekontrolle.**

Die katalytisch inaktive Variante von Ubp3 hatte wie der Deletionsstamm $\Delta ubp3$ eine erhöhte Mitophagie von ungefähr 225% (Abb. 15 A) und eine Hemmung der nicht-selektiven Autophagie etwa 50% (Abb. 15 B) verglichen mit dem komplementierten Stamm. Die Untersuchung der Zelllysate auf den Abbau zytosolischer und mitochondrialer Proteine mit Hilfe SDS-PAGE (Kapitel 2.9.2) und Western Blot (Kapitel 2.9.3) bestätigten die Resultate des ALP-basierten Verfahrens (Abb. 15 C und D). Da in der Ubp3^{C469S} Mutante durch Einsatz eines Protein-spezifischen Antikörpers Ubp3 detektiert werden konnte (Abb. 15 C und D), war der Einfluss durch die Deubiquitinase auf die Mitophagie und die nicht-selektive Autophagie nicht auf eine verminderte Ubp3-Proteinmenge zurückzuführen. Demzufolge ist die katalytische Aktivität der Ubiquitin-spezifischen Protease Ubp3 für die effektive reziproke Regulation der Mitophagie und nicht-selektiven Autophagie erforderlich.

3.1.2 Beeinträchtigung des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes resultiert in einer verstärkten Mitophagie

In Kooperation mit Matthias Müller wurde demonstriert, dass durch die Abwesenheit von *UBP3* oder *BRE5* die Mitophagie verstärkt bzw. die Autophagie inhibiert wird (Müller et al, 2015). Diesbezüglich lag die Frage nahe, ob die Deletion von beiden Proteinen, Ubp3 und Bre5, zu einem synergistischen Effekt hinsichtlich dieser zellulären Prozesse führt. Um dies zu klären, wurde in $\Delta bre5$ bzw. $\Delta ubp3$ zusätzlich der jeweilige Komplexpartner und endogenes *PHO8* deletiert und mittels ALP-basierendem Assay analysiert.

Im Vergleich zum Wildtyp hatten die Einzelmутanten $\Delta ubp3$ bzw. $\Delta bre5$ sowie die Doppelmутanten $\Delta bre5 \Delta ubp3$ bzw. $\Delta ubp3 \Delta bre5$ ein Aktivitätsanstieg der Mitophagie um etwa 50% (Abb. 16 A) und eine Autophagie-Reduktion auf 50% (Abb. 16 B). Die prozentualen Unterschiede in der spezifischen ALP-Aktivität zwischen den Deletionsstämmen waren in allen Fällen nicht signifikant. Die proteolytische Spaltung der mtALP (Abb. 16 C) und cytALP (Abb. 16 D) verifizierten die Ergebnisse der ALP-basierten Analyse. Somit führte die Deletion von *UBP3* und *BRE5* zu keinem additiven Effekt. Der Verlust eines Komplexpartners ist ausreichend für die Beeinflussung der Mitophagie und der nicht-selektiven Autophagie.

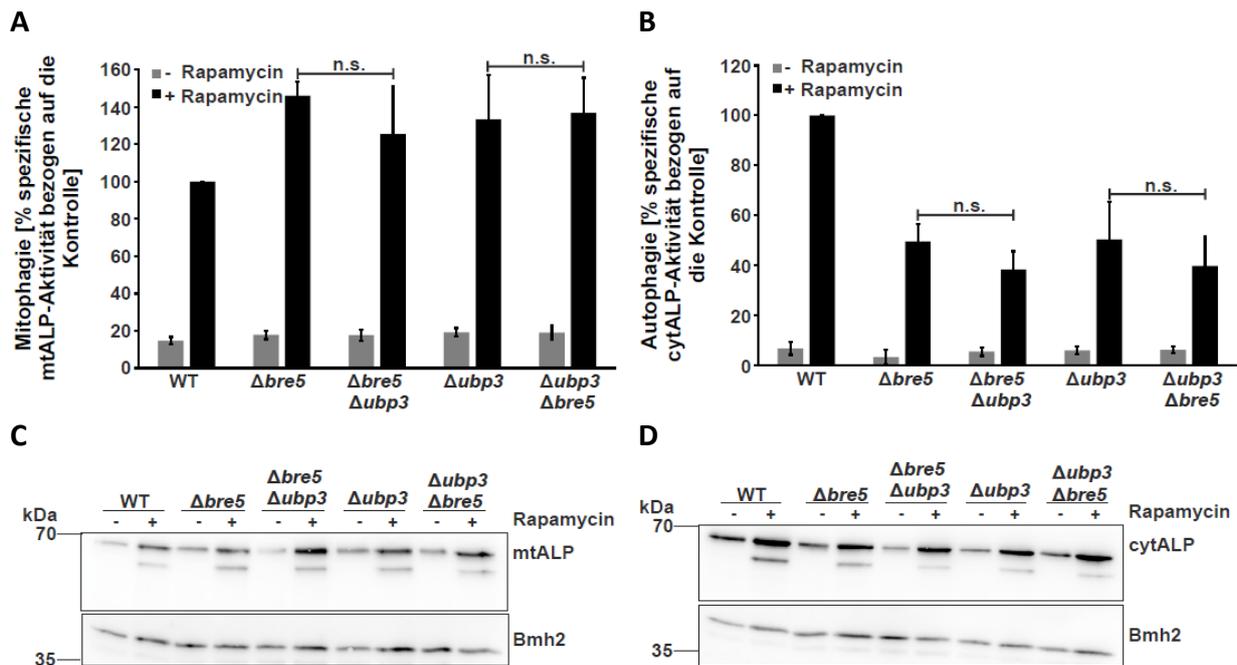


Abbildung 16: Die Doppeldeletion von *BRE5* und *UBP3* führt nicht zu einem additiven Effekt. **A und B**, Stämme mit der angezeigten Deletion und endogenem *PHO8* Knockout wurden mit mtALP (A) oder cytALP (B) transformiert. Die Stämme wurden für mindestens drei Tage in SG-Medium kultiviert und mit Rapamycin (1 μ M, 24 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay bestimmt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) normiert auf den Wildtyp (WT) angegeben. Mittels t-Test wurde die Signifikanz berechnet (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). **C und D**, proteolytische Spaltung der mtALP (C) oder cytALP (D) wurde mittels Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Bmh2 diente als Ladekontrolle.

3.1.3 Ubp3 und Bre5 sind an den Mitochondrien lokalisiert

In der Vergangenheit wurden Ubp3 und Bre5 als Modulatoren der Rapamycin-induzierten Mitophagie identifiziert. Dieser zelluläre Prozess könnte durch das Abtrennen von Ubiquitin-Molekülen von mitochondrialen Außenmembranproteinen vermittelt durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex reguliert werden. Folglich sollte bei einer direkten Reaktion von Ubp3 mit einem Zielprotein das Enzym an den Mitochondrien lokalisiert sein. Um dieser Frage nachzugehen wurde die Lokalisierung von Ubp3 bzw. Bre5 zu definierten Zeitpunkten nach Rapamycin-induzierter Mitophagie in Kooperation mit Müller *et al.* ermittelt (Müller *et al.*, 2015). Hierfür wurde die Lokalisierung der C-terminalen GFP Fusionsproteine von Bre5 und Ubp3 in der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 2.12) bzw. biochemisch durch Western Blot Analyse erfasst. Für die mikroskopische Betrachtung wurden die Stämme zusätzlich mit pHS12-mitoDsRed transformiert.

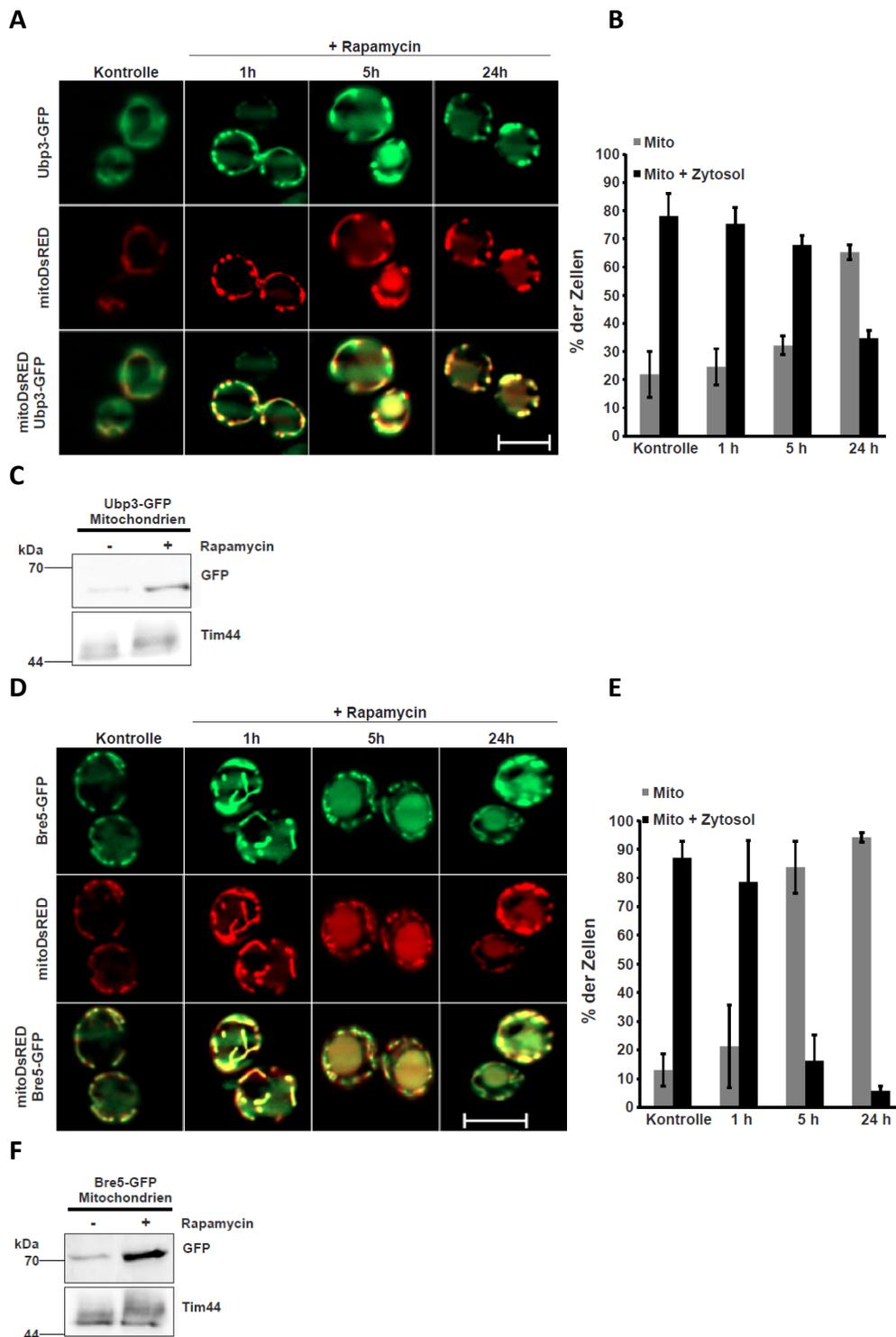


Abbildung 17: Ubp3 und Bre5 translozieren vom Zytosol zu den Mitochondrien nach Rapamycin-induzierter Mitophagie (veröffentlicht in (Müller et al, 2015)). A-F, mitDsrED exprimierende Stämme, welche C-terminales GFP-Fusionsprotein mit Ubp3 (A-C) oder Bre5 (D-F) aufwiesen, wurden per Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Stämme wurden mit Rapamycin für 0, 1, 5 oder 24 Stunden behandelt. Mehr als 50 Zellen wurden in jeweils 3 unabhängigen Versuchen gezählt und der prozentuale Anteil an GFP-Signal nur in den Mitochondrien (Mito) oder auch im Zytosol (Mito+Zytosol) wurde erfasst (B+E). Repräsentative Bilder sind dargestellt. **C und F**, Mitochondrien wurden nach 0 oder 24 Stunden Rapamycin-Behandlung isoliert und die subzelluläre Lokalisation von Ubp3-GFP (C) oder Bre5-GFP (F) mittels Western Blot Analyse durch Verwendung eines anti-GFP Antikörpers bestimmt. Das mitochondriale Protein Tim44 diente als Ladekontrolle.

Die Kultivierung erfolgte in SG-Medium für mindestens drei Tage und 0, 1, 5 oder 24 Stunden Rapamycin-Behandlung. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopiert (Abb. 17 A und D). Der prozentuale Anteil an GFP-Signal nur in den Mitochondrien (Mito) oder Mitochondrien und Zytosol (Mito+Zytosol) wurde in mehr als 50 Zellen in drei unabhängigen Experimenten erfasst (Abb. 17 B und E). Die mikroskopische Detektion des GFP-Signals zeigte eine dynamische Translokation der Proteine Ubp3 und Bre5 vom Zytosol zu den Mitochondrien. Eine fast ausschließlich mitochondriale Lokalisation konnte bereits nach 5 Stunden für Bre5-GFP und nach 24 Stunden für Ubp3-GFP dokumentiert werden.

Für die biochemische Analyse wurden Mitochondrien nach 0 oder 24 Stunden Rapamycin-Behandlung isoliert (Kapitel 2.11.1) und die subzelluläre Lokalisation von Ubp3-GFP (Abb. 17 C) und Bre5-GFP (Abb. 17 F) mittels Western Blot durch Verwendung eines anti-GFP Antikörpers detektiert. Die mitochondriale Lokalisation der Proteine konnte mit dieser Methode verifiziert werden.

Das vorherige Experiment zeigt noch nicht, ob diese Translokation vom Zytosol zu den Mitochondrien abhängig vom jeweiligen Komplexpartner ist, d.h. der Deubiquitinase-Komplex an die Mitochondrien transloziert, oder ob Ubp3 und Bre5 unabhängig voneinander zum Zellorganell wandern. Um dieser Frage nachzugehen wurde im Ubp3-GFP Hefestamm der Co-Faktor Bre5 und die DUB in Bre5-GFP durch Transformation einer genspezifischen Knockout-Kassette ausgeschaltet. Die Lokalisierung der Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot detektiert.

Unter normalen Wachstumsbedingungen (unbehandelt) zeigte die Deubiquitinase Ubp3 in etwa 25% der Zellen und nach Mitophagie-Induktion in 65% der Zellen eine ausschließlich mitochondriale Lokalisation (Abb. 18 A und B). Dies war vergleichbar, wenn Bre5 anwesend war (Vergleich Abb.17 A-C). Die biochemische Analyse bestätigte die subzelluläre Lokalisation der Ubiquitin-spezifischen Protease in der Mitochondrienfraktion, jedoch nahm der Anteil an Ubp3-GFP nach Induktion der Mitophagie ab (Abb. 18 C). Die dynamische Translokation von Ubp3-GFP zum Mitochondrium war somit unabhängig von der Präsenz von Bre5 (Vergleich Abb. 17 mit 18), aber wurde durch den Co-Faktor am Organell stabilisiert.

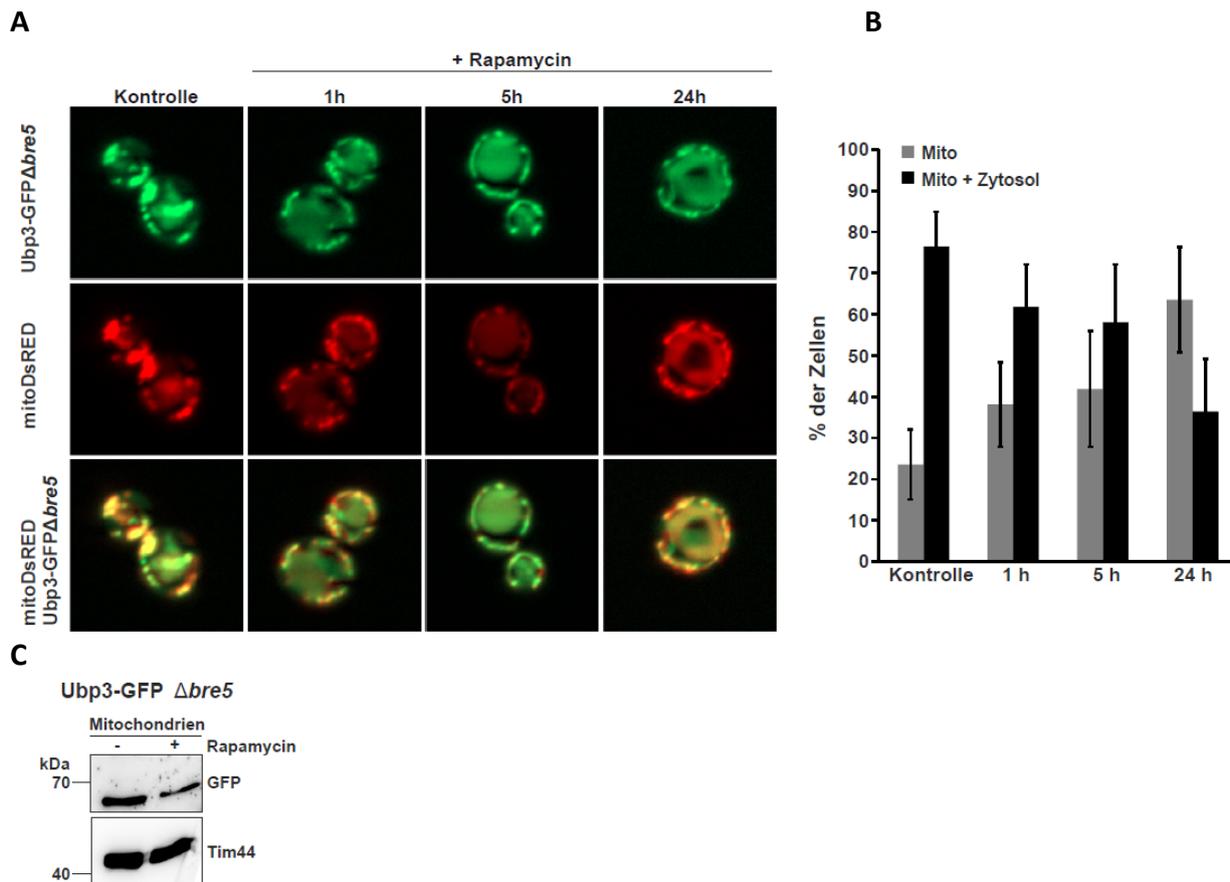


Abbildung 18: Dynamische Translokation der Ubp3 Deubiquitinase zu den Mitochondrien ist Bre5-unabhängig. A-C, mitoDsRED exprimierende Stämme, welche C-terminales GFP-Fusionsprotein mit Ubp3 und Deletion in *BRE5* aufweisen, wurden per Fluoreszenzmikroskopie (A) oder Western Blot Analyse (C) analysiert. Die Stämme wurden mit Rapamycin für 0, 1, 5 oder 24 Stunden behandelt. Mehr als 50 Hefezellen wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten gezählt und der prozentuale Anteil an GFP-Signal nur in den Mitochondrien (Mito) oder Mitochondrien und Zytosol (Mito+Zytosol) wurden erfasst (B). Repräsentative Bilder sind dargestellt. C, Mitochondrien wurden nach 0 oder 24 Stunden Rapamycin-Behandlung isoliert und die subzelluläre Lokalisation von Ubp3-GFP mittels Western Blot Analyse durch Verwendung eines anti-GFP Antikörpers bestimmt. Das mitochondriale Protein Tim44 diente als Ladekontrolle.

Die Detektion des Co-Faktors im unbehandelten Bre5-GFP Δ ubp3 Stamm demonstrierte eine überwiegend mitochondriale und zytosolische Lokalisation des Fusionsproteins (Abb. 19 A und B). Auch hier verschob sich der Anteil des Bre5-GFP Proteins zu rein mitochondrialer Lokalisation nach Rapamycin-induzierter Mitophagie, so dass nach 24 Stunden Behandlung \approx 55% der Zellen ein mitochondriales Bre5-GFP Signal aufwiesen (Abb. 19 A und B). Aus Bre5-GFP Δ ubp3 isolierte Mitochondrien wiesen eine starke Ansammlung an Bre5-GFP auf, der nach Induktion der Mitophagie nach 24 Stunden Rapamycin-Behandlung reduziert war (Abb. 19 C). Diese Abnahme an Co-Faktor in den Mitochondrien ist nicht eindeutig, da auch die Ladekontrolle Tim44 daraufhin deutet, dass allgemein in dieser Probe weniger Proteinmengen

vorhanden war. Im Vergleich mit Hefezellen, die Ubp3 aufweisen, scheint die dynamische Translokation von Bre5 in Abwesenheit des Komplexpartners abgeschwächt zu sein (Vergleich Abb. 17 mit 19). Darüber hinaus wurden zwei weitere Banden (~80 und 130 kDa) für Bre5, die eventuell Modifikation des Co-Faktors sind, durch den anti-GFP Antikörper detektiert.

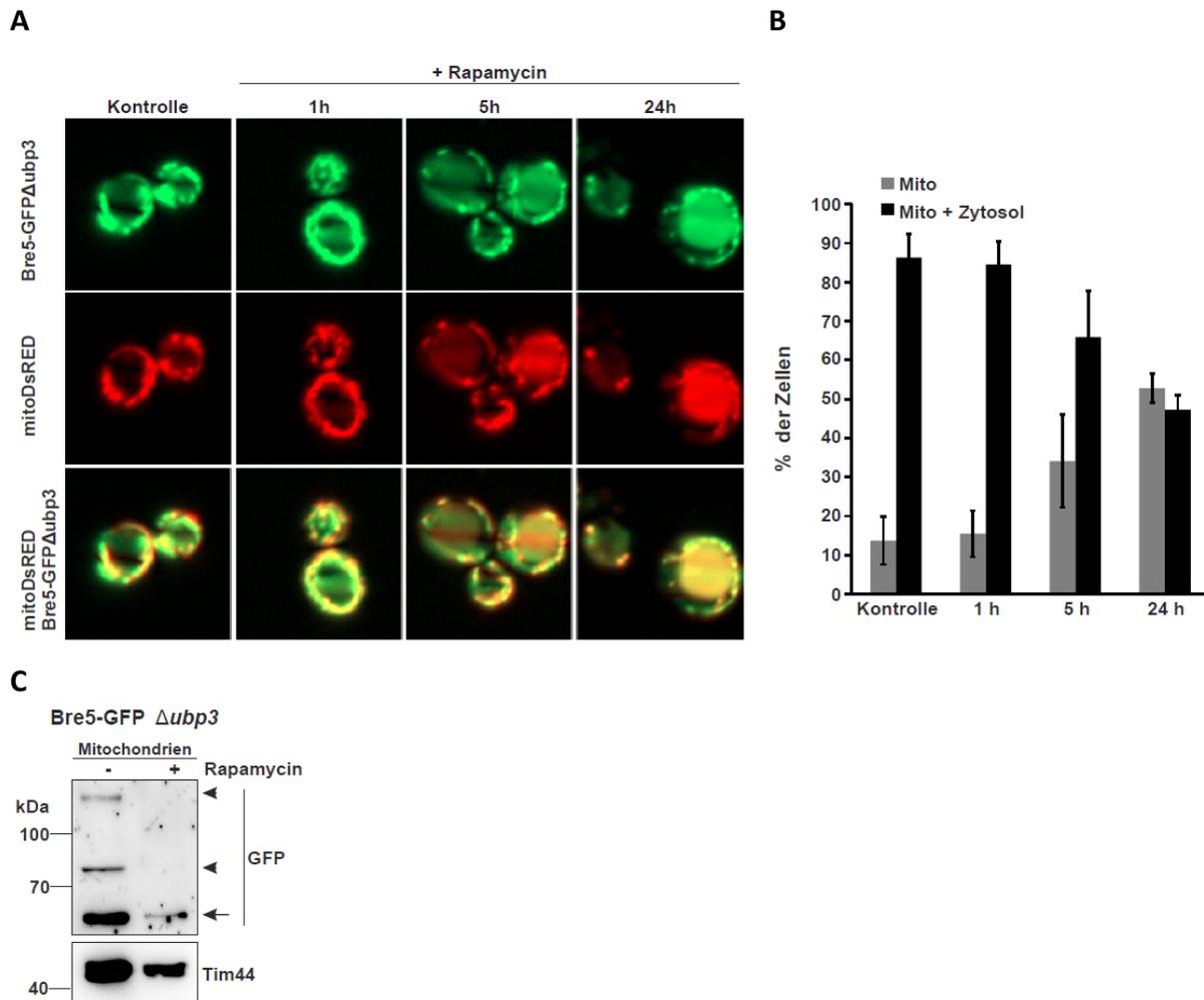


Abbildung 19: Dynamische Translokation des Co-Faktors Bre5 ist abhängig von Ubp3. A-C, mitoDsRED exprimierende Stämme, welche C-terminales GFP-Fusionsprotein mit Bre5 und Deletion in *UBP3* aufweisen, wurden per Fluoreszenzmikroskopie (A) oder Western Blot Analyse (C) analysiert. Die Stämme wurden mit Rapamycin für 0, 1, 5 oder 24 Stunden behandelt. Mehr als 50 Hefezellen wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten gezählt und der prozentuale Anteil an GFP-Signal nur in den Mitochondrien (Mito) oder Mitochondrien und Zytosol (Mito+Zytosol) wurden erfasst (B). Repräsentative Bilder sind dargestellt. C, Mitochondrien wurden nach 0 oder 24 Stunden Rapamycin-Behandlung isoliert und die subzelluläre Lokalisation von Bre5-GFP mittels Western Blot Analyse durch Verwendung eines anti-GFP Antikörpers bestimmt. Das mitochondriale Protein Tim44 diente als Ladekontrolle. Der Pfeil repräsentiert unmodifiziertes und die Pfeilspitzen modifiziertes Bre5.

3.1.4 Der Einfluss des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes auf die Mitophagie ist Atg32-abhängig

In Säugern existieren mehrere Möglichkeiten um den selektiven Abbau von Mitochondrien zu induzieren. Neben dem gut untersuchten Ubiquitin-vermittelten PINK1/Parkin Induktionsweg benötigen andere Wege mitochondriale Rezeptoren, wie zum Beispiel NIX1, BNIP3 oder FUNDC1. Diese können direkt durch die LIR-Sequenz mit dem autophagosomalen Markerprotein LC3 interagieren (Kapitel 1.3.2.1). Es gibt jedoch Anhaltspunkte, dass der Rezeptor-vermittelte und der Ubiquitin-vermittelte Weg miteinander interagieren. So demonstrierten Ding et al., dass NIX1 für die Rekrutierung von der E3-Ligase-Parkin benötigt wird (Ding et al, 2010). In *S. cerevisiae* ist die Rezeptor-vermittelte Mitophagie ebenfalls etabliert und benötigt das mitochondriale Außenmembranprotein Atg32. Bisher gibt es nur wenige Anzeichen dafür, dass der Ubiquitin-abhängige Weg in Hefe evolutionär konserviert ist. In Kooperation mit Müller et al. konnte indirekt gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung in der Aktivierung der Mitophagie involviert ist (Müller et al, 2015). Daher sollte analysiert werden, ob die Regulation des selektiven mitochondrialen Abbaus durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex Atg32-abhängig ist oder ob dieser Induktionsweg einen alternativen, ausschließlich Ubiquitin-abhängigen Weg in Hefe darstellt.

Aus diesem Grund wurde in den Stämmen $\Delta bre5$ und $\Delta ubp3$ das Gen *ATG32* deletiert. Nach Kultivierung in SG-Medium und Rapamycin-Behandlung (0 oder 24 Stunden) wurde die spezifische ALP-Aktivität mittels ALP-basiertem Assay bestimmt. Der Verlust des Außenmembranproteins führte in allen Stämmen zu einem kompletten Block der Mitophagie (Abb. 20 A). Die Regulation der selektiven Eliminierung von Mitochondrien vermittelt durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex ist demnach von der Präsenz von Atg32 abhängig. Auf der anderen Seite war die nicht-selektive Autophagie in Zellen, denen *BRE5* oder *UBP3* fehlte, unverändert durch die zusätzliche Deletion von *ATG32* (Abb. 20 B). Der Einfluss von Bre5 oder Ubp3 auf die nicht-selektive Autophagie ist demzufolge unabhängig vom mitochondrialen Rezeptor Atg32.

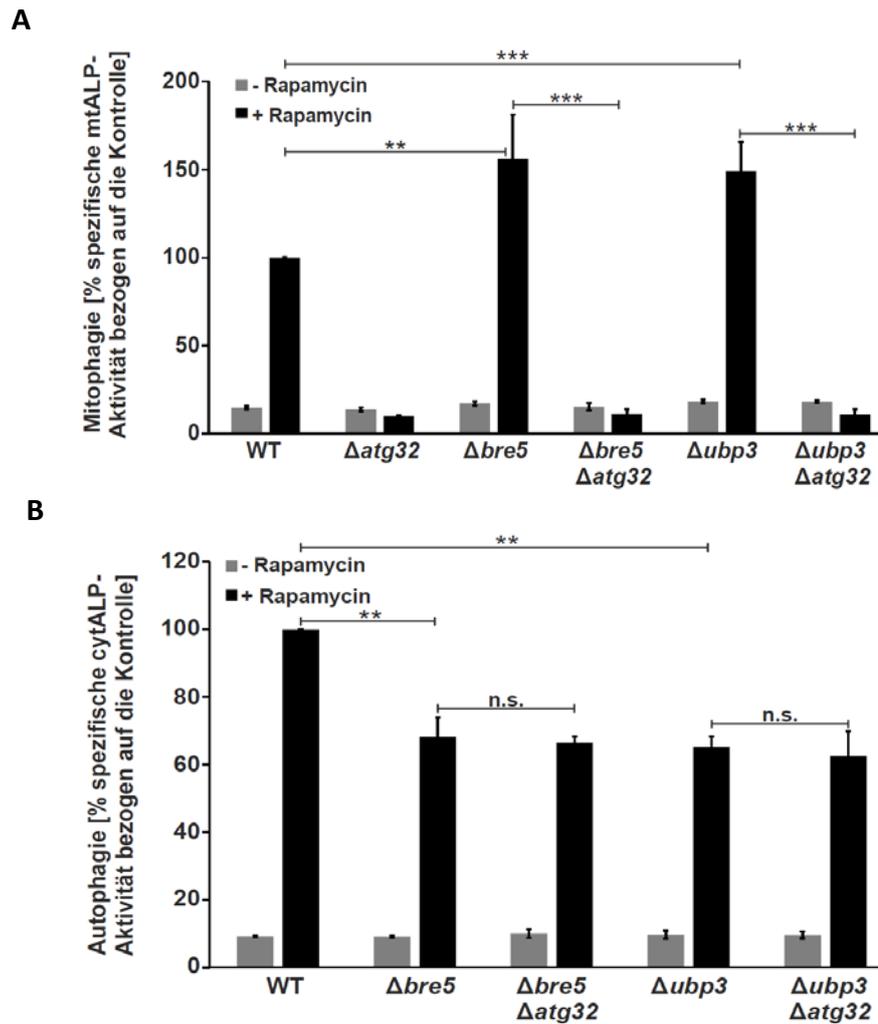


Abbildung 20: Die Mitophagie wird Atg32-abhängig durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex reguliert. A und B, Stämme mit der angegebenen Deletion und endogenem *PHO8* Knockout wurden mit mtALP (A) oder cytoplasmatischer ALP (B) transformiert. Die Stämme wurden für mindestens drei Tage in SG-Medium kultiviert und mit Rapamycin (1 μ M, 24 Stunden) behandelt oder blieben unbehandelt. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay bestimmt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) normiert auf den Wildtyp (WT) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2 Einfluss der nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene auf verschiedene Formen der Autophagie

3.2.1 Ubi4 ist erforderlich für die Mitophagie in *S. cerevisiae*

Müller *et al.* dokumentierten eine reduzierte Mitophagie-Aktivität für $\Delta ubi4$ (50,5% verglichen mit dem Wildtyp, (Müller *et al.*, 2015)). Die gleichnamige Studie zeigte wiederum, dass die

Mutation der zwei anderen Ubiquitin-kodierenden Gene *UBI1* und *UBI2* keine signifikanten Effekte auf den selektiven mitochondrialen Abbau hat. Für eine Verifikation dieser Ergebnisse wurden die jeweiligen Stämme separat kultiviert und die quantitative Aktivität der Rapamycin-induzierten Mitophagie mittels ALP-Assay analysiert. Tatsächlich zeigte nur die Deletion des Gens *UBI4* eine signifikante Reduktion der selektiven Eliminierung von Mitochondrien um etwa 75% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21).

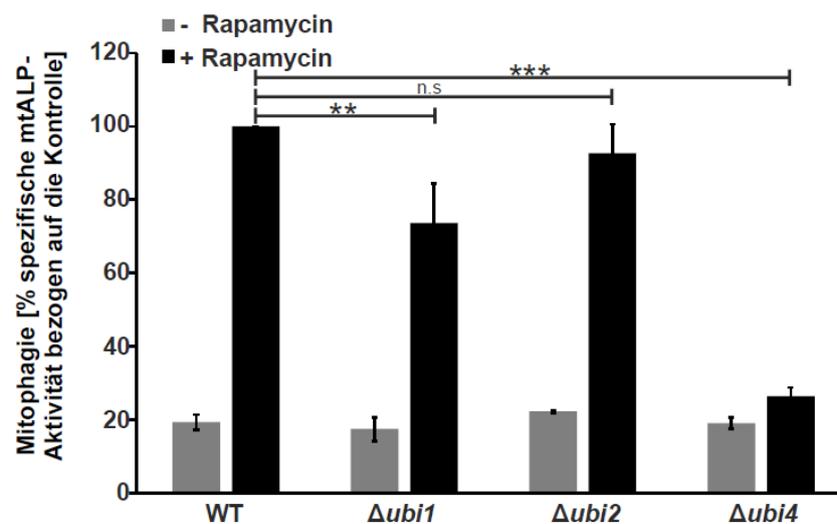


Abbildung 21: Deletion von *UBI4* führt zur drastischen Reduktion der Mitophagie. In den Stämmen mit der angezeigten Gendeletion wurden manuell endogenes *PHO8* ausgeknockt und mit dem Plasmid pYX242mtALP transformiert. Die Mitophagie-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay nach 24 h Rapamycin-Behandlung bzw. unbehandelt in SG-Medium bestimmt. Die spezifische mtALP Aktivität ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Die Mutante $\Delta ubi1$ hatte eine um etwa 20% verminderte Mitophagie. In Abwesenheit von *UBI2* lag eine nicht signifikante Reduktion von unter 10 Prozent vor. Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass die Induktion der Mitophagie abhängig vom Ubiquitin-kodierenden Gen *UBI4* ist.

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse methodenabhängig sind, wurde ein zweites Verfahren zur Analyse der Mitophagie verwendet. Zu diesem Zweck wurde der mtDHFR-GFP-Assay verwendet. Dieses Verfahren beruht darauf, dass das Fusionsprotein mtDHFR-GFP (mitochondriales Matrixprotein Su9 geknüpft an das grün fluoreszierende Protein (GFP)) nach Mitophagie-Induktion im Autophagosom zur Vakuole transportiert wird, wo es nach der Lyse des Autophagosoms abgebaut wird. Da freies GFP relativ resistent gegen die Proteolyse in der

Vakuole ist, lässt es sich im Zelllysat durch Western Blot Analyse detektieren und spiegelt den Grad an Mitophagie wieder. Die Stämme wurden hierfür unter respiratorischen Bedingungen durch Verwendung von SG-Medium kultiviert und mit 1 μ M Rapamycin für 24 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt. Der Wildtyp zeigte nach Antibiotikaeinsatz eine starke Akkumulation von freiem GFP im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abb. 22 A und B).

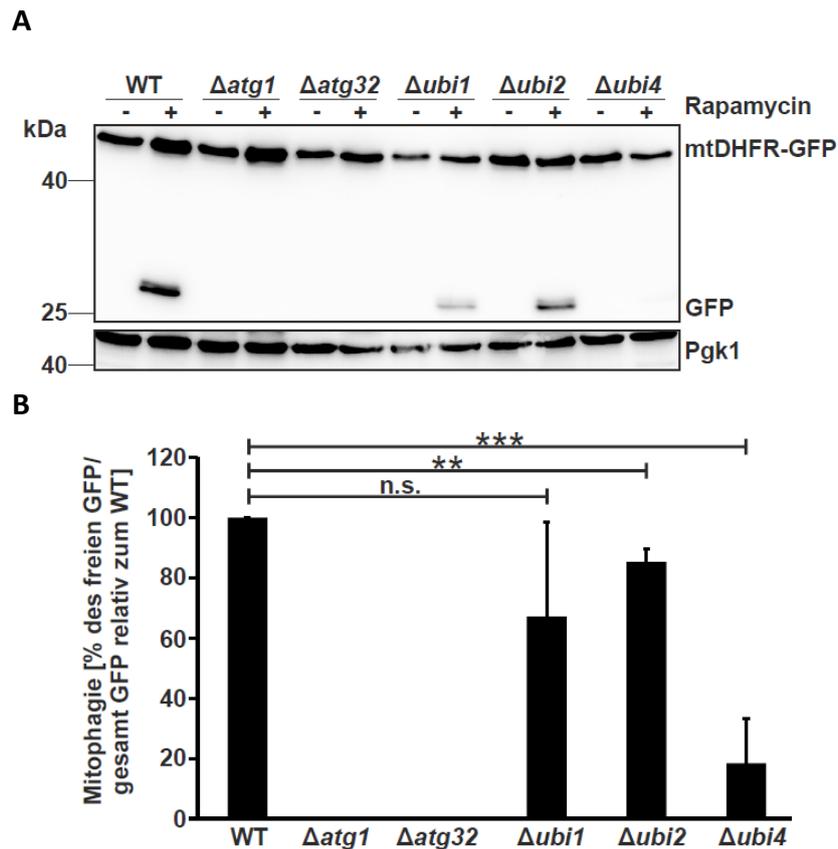


Abbildung 22: Mitophagie ist stark inhibiert im $\Delta ubi4$ Stamm. **A**, Stämme, die die angegebene Gendelektion aufweisen und mito-GFP exprimieren wurden 24 h mit 1 μ M Rapamycin behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Vakuoläre Proteolyse des mtDHFGR-GFP führt zur Akkumulation von freiem GFP, das mittels Western Blot Analyse des Zelllysats detektiert wurde. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot. Pgk1 diene als Ladekontrolle. **B**, Auswertung der Bandensignale mittels ImageJ. Angegeben ist der Mittelwert ($n \geq 3$) normiert zum Wild Typ. Die Signifikanz wurde durch t-Test (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$) berechnet.

$\Delta atg1$ und $\Delta atg32$ zeigten keine mtDHFGR-GFP Degradation (Abb. 22 A und B). Dies war zu erwarten, da Atg1 eine grundlegende Komponente der Autophagie-Maschinerie und Atg32 essentiell für die Mitophagie ist. Beide dienen daher als Negativkontrolle. Die Stämme $\Delta ubi1$ und $\Delta ubi2$ hatten zwar im Vergleich zum WT weniger freies GFP, aber auch einen geringeren

Anteil an Fusionsprotein mtDHFR-GFP. Das Verhältnis von freiem GFP zu gesamt GFP (Abb. 22 B) schwankte bei $\Delta ubi1$ stark. Weder $\Delta ubi1$ noch $\Delta ubi2$ zeigten einen deutlichen Effekt auf die Mitophagie. Durch Deletion von *UBI4* entstand eine kaum nachweisbare Akkumulation an freiem GFP. Die Ergebnisse spiegeln die Resultate aus dem ALP-Assay demnach sehr gut wider. Zusammengefasst lässt sich daraus schlussfolgern, dass spezifische *UBI4* für die Mitophagie benötigt wird.

Zur Überprüfung der Spezifität von $\Delta ubi4$ und zur Ermittlung eines möglichen Effekts von Ubi1 und Ubi2 wurde im Weiteren die nicht-selektive Autophagie in diesen Stämmen betrachtet. Zu diesem Zweck wurde mittels ALP-basierendem Assay die nicht-selektive Autophagie-Aktivität nach Rapamycin-Behandlung analysiert. Die Abwesenheit von *UBI1*, *UBI2* oder *UBI4* führte zu keiner signifikanten Hemmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 23) und hatte demzufolge keinen Einfluss auf die nicht-selektive Autophagie.

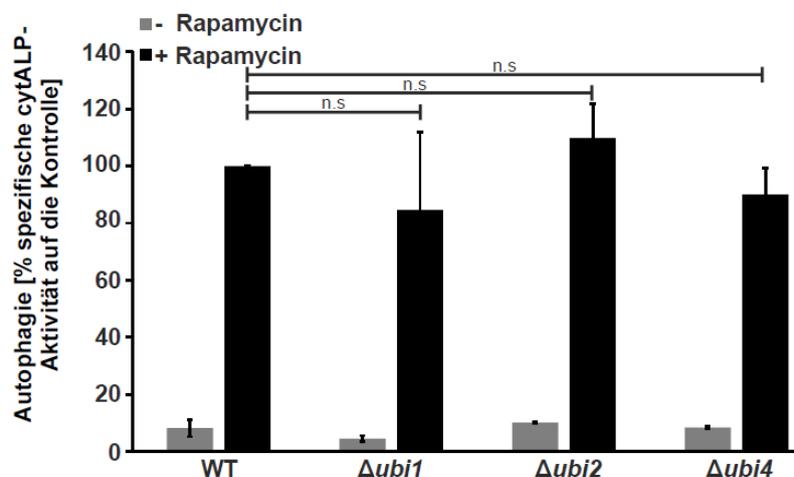


Abbildung 236: Die Autophagie wird durch die nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene nicht beeinflusst. In den Stämmen mit der angezeigten Gendeletion und *PHO8* Knockout wurden mit dem Plasmid pYX242cytALP transformiert. Der Level an Autophagie-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay nach 24 Rapamycin-Behandlung bzw. unbehandelt in SG Medium bestimmt. Die spezifische cytALP ist als Mittelwert ($n \geq 3$), normiert zum Wildtyp nach Rapamycin-Behandlung, angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Mittels GFP-Atg8 Assay wurde eine zweite Methode herangezogen, um den Einfluss der Deletion in den entsprechenden Genen zu analysieren. Dieses Prozessierungsverfahren funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie der mtDHFR-GFP Assay. Das Protein Atg8, welches essentiell für die Autophagosombildung ist, ist an GFP gekoppelt. Durch Induktion der nicht-

selektiven Autophagie durch Rapamycin-Behandlung gelangt das Fusionsprotein in die Vakuole und wird geschnitten. Da GFP gegenüber dem Abbau stabiler ist, lässt sich die Akkumulation an freiem GFP mittels Western Blot Analyse detektieren. Die Negativkontrolle $\Delta atg1$ zeigte keinerlei Akkumulation an freiem GFP (Abb. 24 A). Im Vergleich dazu zeigten alle anderen Deletionsstämme sowie der Wildtyp eine massive Ansammlung an freiem GFP bezogen auf das Fusionsprotein GFP-Atg8 (Abb. 24 B).

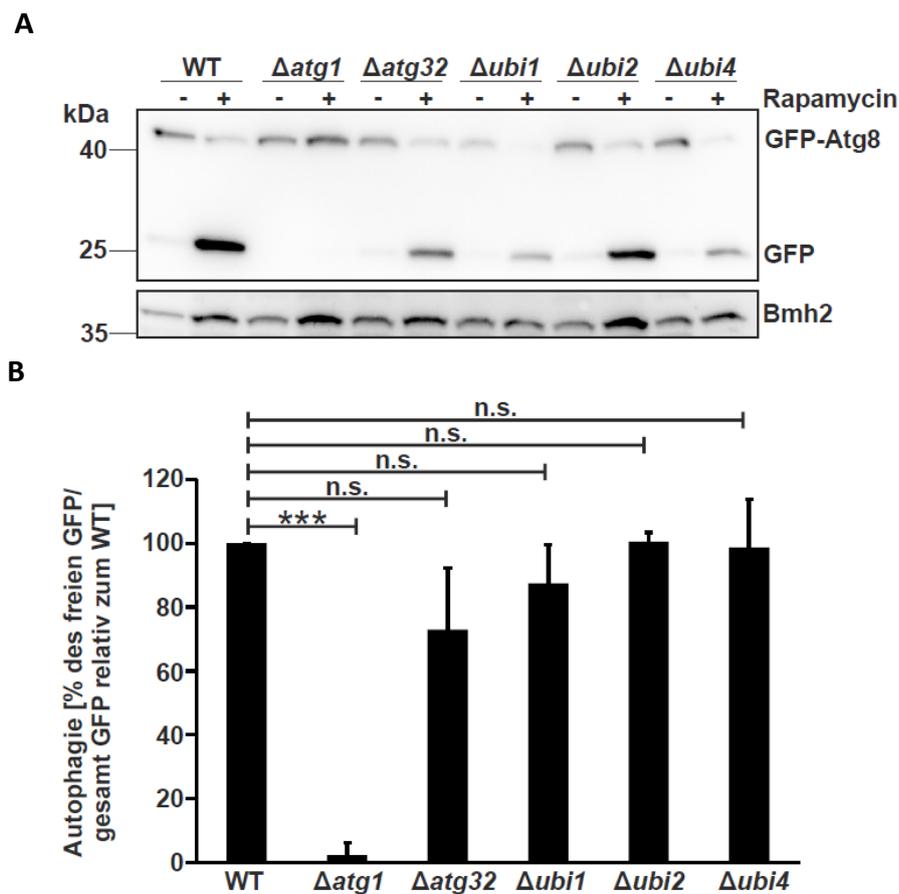


Abbildung 24: Atg8-GFP Assay. **A**, Stämme, die die beschriebene Gendelektion aufweisen und GFP-Atg8 exprimieren wurden 24 h mit 1 μ M Rapamycin behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Vakuoläre Proteolyse des GFP-Atg8 führt zur Akkumulation von freiem GFP, das mittels Western Blot Analyse des Zelllysats detektiert wurde. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot. Bmh2 diente als Ladekontrolle. **B**, Auswertung der Bandensignale mittels ImageJ. Angegeben ist der Mittelwert ($n \geq 3$) normiert zum Wildtyp (WT). Die Signifikanz wurde durch t-Test (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$) berechnet.

Keins der drei nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene hatte demnach einen erkennbaren Einfluss auf die nicht-selektive Autophagie.

3.2.2 Einfluss der drei nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene auf andere Formen der selektiven Autophagie

Frühere Studien belegten eine Assoziation zwischen der Ubiquitinierung bzw. der Deubiquitinierung und unterschiedlichen Formen der selektiven Autophagie. Kraft *et al.* demonstrierten, dass die Deubiquitinase Ubp3 einen Komplex mit den Proteinen Bre5, Cdc48 und Ufd2 bildet und in die 60S Ribophagie, jedoch nicht in die 40S Ribophagie, involviert ist (Kraft *et al.*, 2008). Des Weiteren dokumentierten Müller *et al.* eine reziproke Regulation des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes auf die Mitophagie und die nicht-selektive Autophagie (Müller *et al.*, 2015). Diese Befunde ließen die Hypothese zu, da lediglich *UBI4* verantwortlich für die mitochondriale Demontage war, dass die zwei Ubiquitin-kodierenden Gene *UBI1* und *UBI2* an anderen Formen der selektiven Autophagie beteiligt sind.

Aus diesem Grund wurde die Einwirkung von $\Delta ubi1$, $\Delta ubi2$ und $\Delta ubi4$ auf die Ribophagie (40S und 60S Degradation), den Cvt-Weg und die ER-phagie untersucht. Für die Analyse wurde der Rpl25-GFP-Assay (60S Ribophagie), Rps2-GFP-Assay (40S Ribophagie) oder Sec63-GFP-Assay (ER-phagie) eingesetzt. Das Prinzip dahinter ist bei allen drei Formen der selektiven Autophagie gleich. Durch Expression eines Organell-spezifischen Proteins fusioniert an GFP gelangt die Chimäre nach Induktion des Abbauweges in die Vakuole. Da GFP durch vakuoläre Enzyme nicht degradiert wird, lässt sich eine Akkumulation des freien Moleküls über Western Blot Analyse detektieren. Die jeweiligen Stämme wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Die Betrachtung des Cvt-Wegs erforderte kein zusätzliches Plasmid, sondern erfolgte durch den spezifischen Einsatz des anti-Ape1 Antikörpers. Die Kultivierung erfolgte im SG-Medium und der jeweilige zelluläre Prozess wurde durch 24 Stunden 1 μ M Rapamycin-Behandlung induziert.

Die 60S Ribophagie war signifikant in $\Delta ubi1$ und $\Delta ubi4$ inhibiert (Abb. 25 A). Ebenso zeigte $\Delta ubi4$ eine deutlich reduzierte 40S Ribophagie ($\approx 50\%$ verglichen mit dem WT), wobei $\Delta ubi1$ und $\Delta ubi2$ eine um 30% erhöhte GFP-Akkumulation im Vergleich zum WT aufwiesen (Abb. 25 B). Alle drei Gendelektionen hatten keinen Effekt auf den Cvt-Weg (Abb. 25 D), aber eine deutlich verminderte ER-phagie (Abb. 25 C).

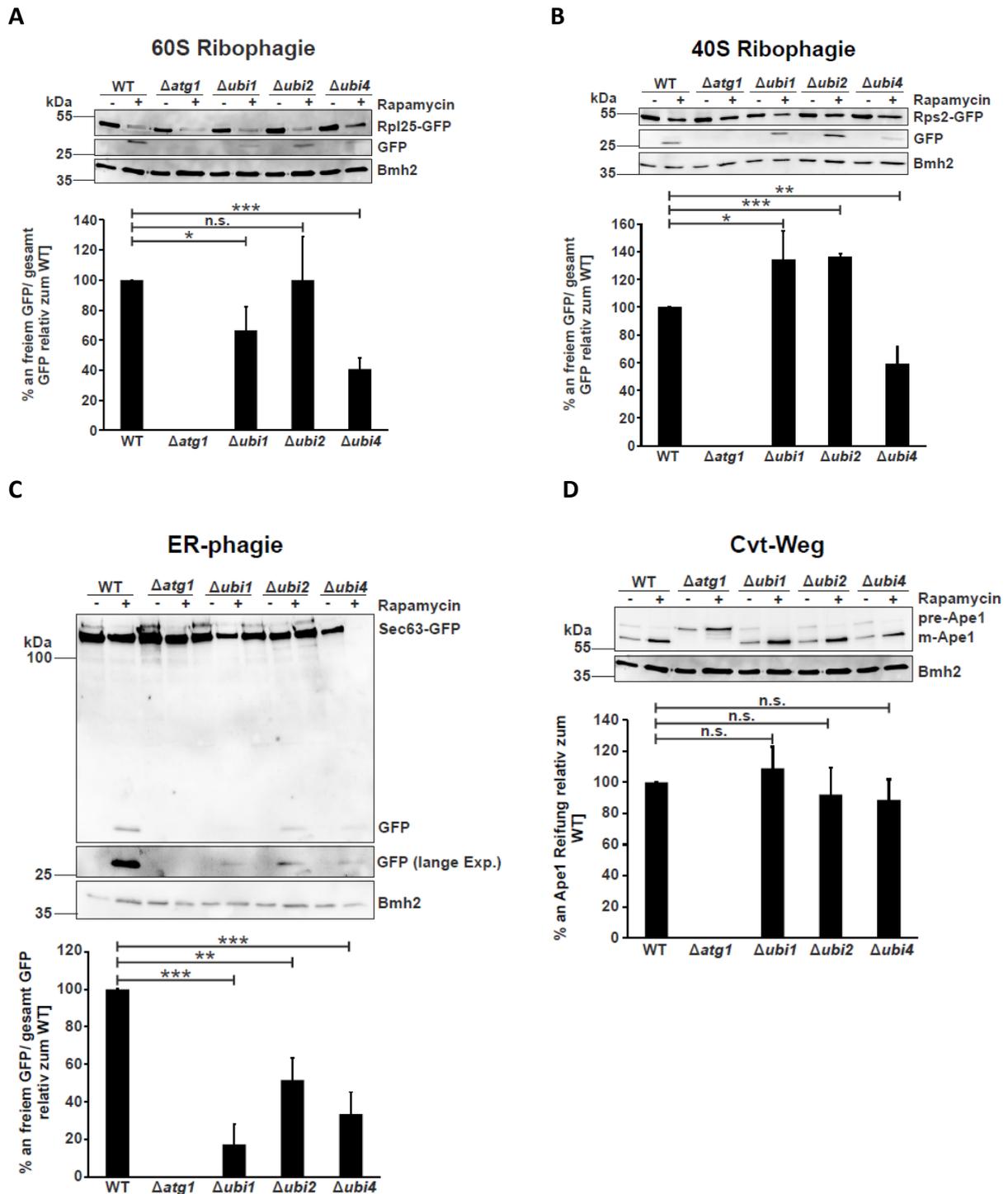


Abbildung 25: Die Ubiquitin-kodierenden Gene modulieren Ribophagie und ER-phagie aber nicht den Cvt-Weg. A-C, Stämme, die die beschriebene Gendelektion aufweisen und Rpl25-GFP (A), Rps2-GFP (B) oder Sec63-GFP (C) exprimieren, wurden mit 1 μ M Rapamycin (0 oder 24 Stunden) behandelt. Vakuoläres Schneiden der Fusionsproteine führte zur Akkumulation von freiem GFP, das mittels Western Blot Analyse des Zelllysats detektiert wurde. D, Detektion der Ape1-Reifung mittels Ape1-Antikörper um den Cvt-Weg zu analysieren. Induktion erfolgte durch Behandlung mit Rapamycin. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot. Bmh2 diente als Ladekontrolle. Auswertung der Bandensignale mittels ImageJ. Angegeben ist der Mittelwert ($n \geq 3$) normiert zum Wildtyp. Berechnung der Signifikanz durch t-Test (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Zusammenfassend ergibt sich aus den Untersuchungen, dass die Deletion von *UBI1* die 60S Ribophagie und ER-phagie, $\Delta ubi2$ den Abbau der kleinen ribosomalen Untereinheit und die ER-phagie beeinflussen (Abb. 26). Das Ausschalten des Polyubiquitin-kodierenden Gens *UBI4* hatte neben der Inhibierung der Mitophagie auch die Reduktion der Ribophagie (60S und 40S) und ER-phagie zur Folge.

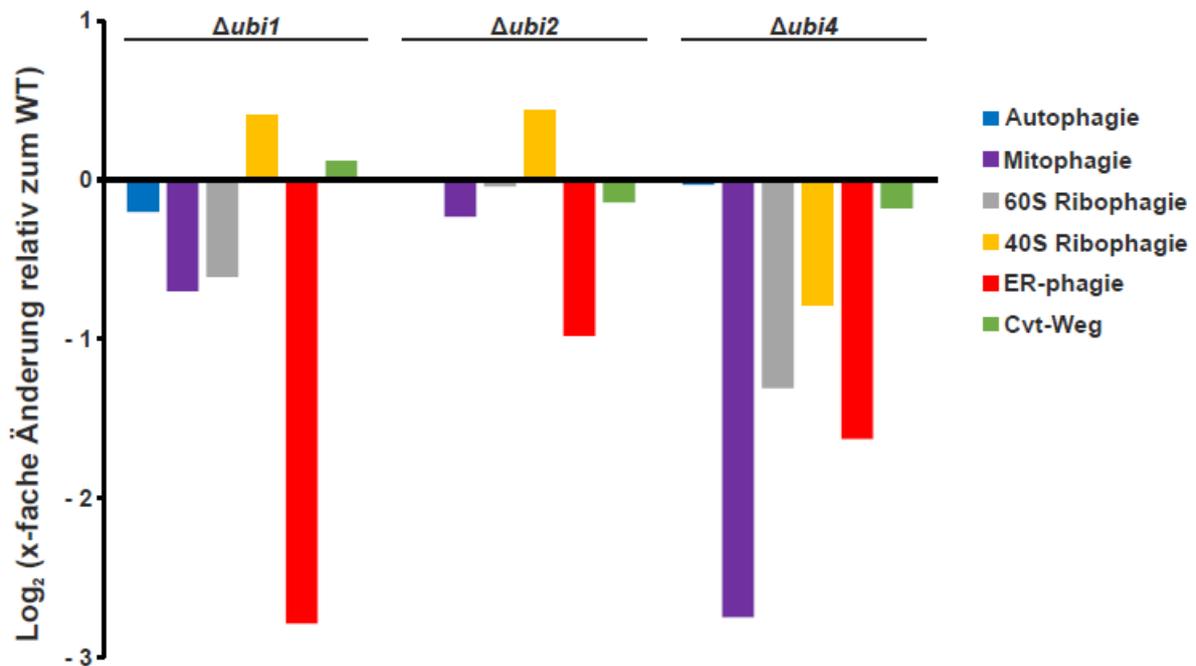


Abbildung 26: Zusammenfassung der Effekte der Ubiquitin-Gene auf verschiedene Formen der Autophagie. Dargestellt ist der Einfluss der Deletion von den drei nicht essentiellen Ubiquitin-codierenden Genen, der bei der Untersuchung der unterschiedlichen Formen der Autophagie beobachtet wurde.

3.2.3 Ubi4 ist generell für die Mitophagie erforderlich

Um sicher zu gehen, dass die Beeinflussung der Mitophagie direkt auf die Deletion von *UBI4* zurückzuführen ist, wurde eine Komplementierungsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde ein Plasmid, das das Gen unter der Kontrolle des endogenen Promotors herstellt, in die Deletionsmutante integriert. Tatsächlich konnte die endogene Expression von *UBI4* die Mitophagie-Reduktion vollständig umkehren (Abb.27 A und C). Die spezifische mtALP-Aktivität und die proteolytische Spaltung der mtALP waren im komplementierten Deletionsstamm ($\Delta ubi4 + Ubi4$) äquivalent zum Wildtyp. Durch Transformation des Leervektors in $\Delta ubi4$ zeigte dieser Hefestamm eine leicht reduzierte Autophagie von ungefähr

30% im Vergleich zum Wildtyp, die durch Expression von Ubi4 über das entsprechende Plasmid komplementiert wurde (Abb. 27 B und D). Es wurde hier eine geringe Inhibition der nicht-selektiven Autophagie festgestellt, die wahrscheinlich auf die Integration des Leervektors zurückzuführen ist. Daraus ergibt sich, dass Ubi4 ein spezifischer Mitophagie-Modulator ist.

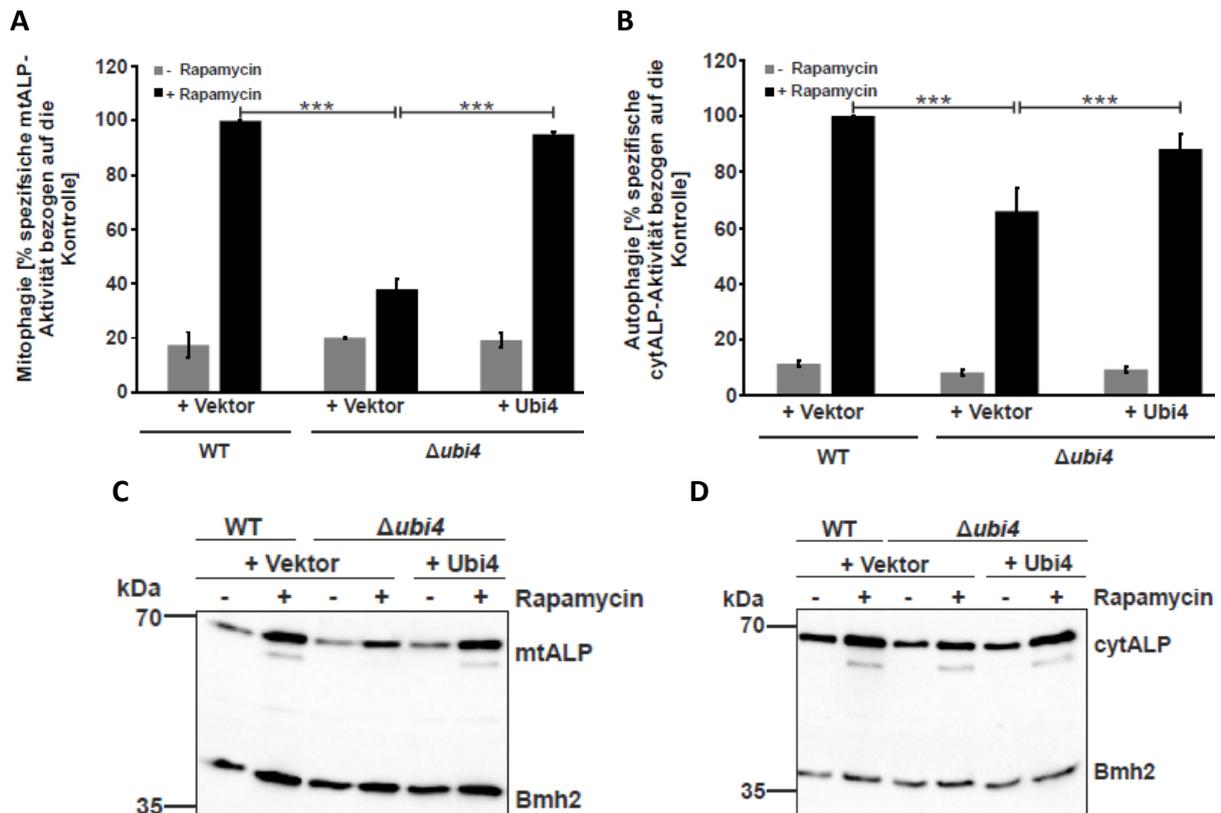


Abbildung 27: Ubi4 ist ein spezifischer Mitophagie-Modulator. **A und B**, Stämme, denen endogenes *PHO8* und das beschriebene Gen fehlt, wurden mit pXY242mtALP (A+C) oder pYX242cytALP (B+D) und pRS416-Ubi4 oder Leervektor (pRS416) transformiert. Nach Rapamycin-Behandlung (0 oder 24 h, 1 μ M) wurde die spezifische ALP-Aktivität mittels ALP-basiertem Verfahren in SG-Medium analysiert. Die spezifische Aktivität ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (***: $p \leq 0,001$). **C und D**, proteolytische Spaltung der mtALP (C) oder cytALP (D) wurde mittels Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Bmh2 diente als Ladekontrolle.

Neben der hier angewendeten Methode zur Induktion der Mitophagie durch Rapamycin-Behandlung, existieren noch weitere Möglichkeiten um diesen Prozess zu aktivieren (Kapitel 1.3.1.1). Daher sollte überprüft werden, ob Ubi4 lediglich an der Rapamycin-induzierten Mitophagie involviert ist. Ein mehrstündiger Stickstoffmangel durch Überführen der Hefezellen vom laktathaltigem Medium (SL-Medium) zu glukosereichem

Stickstoffmangelmedium (SD-N-Medium) führt zur rapiden Induktion der Mitophagie und der nicht-selektiven Autophagie.

Die Deletion von *UBI4* resultierte auch bei diesen Bedingungen zu einer starken Mitophagie- (Abb. 28 A) und Autophagie-Reduktion (Abb. 28 B). $\Delta ubi4$ zeigte im Vergleich zum Wildtyp und dem komplementierten Deletionsstamm nach 24 Stunden Stickstoffmangel eine um die Hälfte reduzierte spezifische ALP-Aktivität. Die lange Kultivierung der Hefestämme im Medium mit nicht-fermentativer Kohlenstoffquelle (SL-Medium) in der stationären Phase stellt eine weitere Methode dar, um den selektiven Abbau von Mitochondrien und die nicht-selektive Autophagie zu aktivieren.

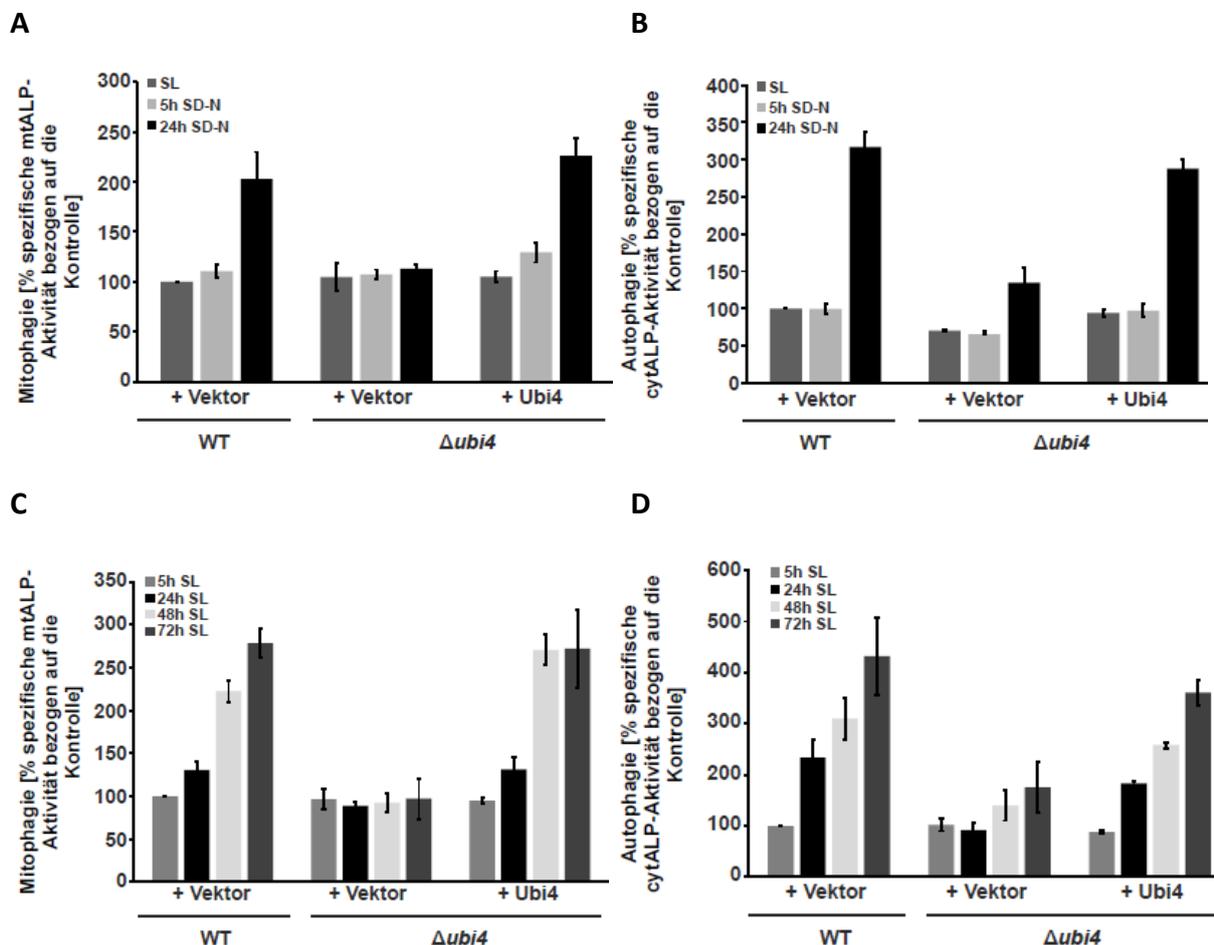


Abbildung 28: Ubi4 fördert die Mitophagie unabhängig von der Induktionsmethode. A-D, Stämme, denen endogenes *PHO8* und das beschriebene Gen fehlt, wurden mit pXY242mtALP (A+C) oder pXY242cytoALP (B+D) und pRS416-Ubi4 oder Leervektor (pRS416) transformiert. Die Mitophagie wurden durch einen Wechsel von SL-Medium auf stickstoffarmes SD-N-Medium (A+B) oder durch Kultivierung in der stationären Phase in nicht-fermentativem SL-Medium (C+D) für die angegebene Zeit induziert. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basiertem Assay detektiert und ist als Mittelwert \pm SD ($n \geq 3$) angegeben. Normiert wurde auf den Wildtyp bei 0 Stunden Stickstoffmangel (A+B) oder auf den Wildtyp bei 5 Stunden Wachstum in SL-Medium (C+D).

Auch diese Behandlung führte in $\Delta ubi4$ zu einer drastisch verminderten Aktivität der Mitophagie (Abb. 28 C) und der nicht-selektiven Autophagie (Abb. 28 D). Dieser Einfluss wurde wiederum durch die Expression von Ubi4 komplementiert. Ubi4 ist unabhängig von der Induktionsmethode für die Mitophagie, sowie abhängig von den experimentellen Konditionen für die nicht-selektive Autophagie, erforderlich.

3.2.4 Die Verknüpfung von Ubiquitin via K48 ist für die Mitophagie erforderlich

Ubiquitin kann durch seine sieben Lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) oder dem N-Terminus an ein anderes geknüpft werden und dadurch unterschiedliche Ketten bilden. In Säugern stehen unter anderem K48- und K63-verknüfte Ubiquitinketten in Verbindung mit der Induktion der Mitophagie (Chan et al, 2011; Cornelissen et al, 2014). Da bislang nur wenig über die Ubiquitin-vermittelte Mitophagie in Hefe bekannt ist, sollte die entsprechende Ubiquitinkettenverknüpfung im $\Delta ubi4$ Stamm identifiziert werden. Zur Untersuchung der entsprechenden Makromolekülverbindung wurde $\Delta ubi4$ neben dem entsprechenden ALP-Expressionsplasmid mit einem Wildtyp-Ubiquitin- (WT Ub) oder Ubiquitinvariante-exprimierendem Plasmid (UbK48R, UbK63R oder UbK48R_K63R) transformiert. Bei der Expression der Ubiquitinvarianten werden Ubiquitin-Moleküle synthetisiert, in welchen die Lysine der Positionen 48 oder 63 oder an beiden Positionen zu Arginin substituiert sind und dadurch Kettenverknüpfungen an diesen Positionen nicht mehr möglich sind.

Nach Rapamycin-Behandlung zeigten die Mutanten UbK48R und UbK48R_K63R wie $\Delta ubi4$ (+ Vektor) eine um 50 % inhibierte Mitophagie im Vergleich zur Expression des Wildtyp-Ubiquitins (Abb. 29 A). Die Mutation des Lysins K63 führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des selektiven mitochondrialen Abbaus im Vergleich zum WT Ubiquitin. Die Expression keiner der drei Ubiquitinvariante führte zu einer signifikanten Veränderung der nicht-selektive Autophagie (Abb. 29 B). Die proteolytische Spaltung von mtALP (Abb. 29 C) und cytALP (Abb. 29 D) stimmte mit den ALP-Aktivitäten überein. Daraus folgt, dass die K48-Ubiquitinkettenverknüpfung für die effektive Mitophagie-Vermittlung in $\Delta ubi4$ essentiell ist.

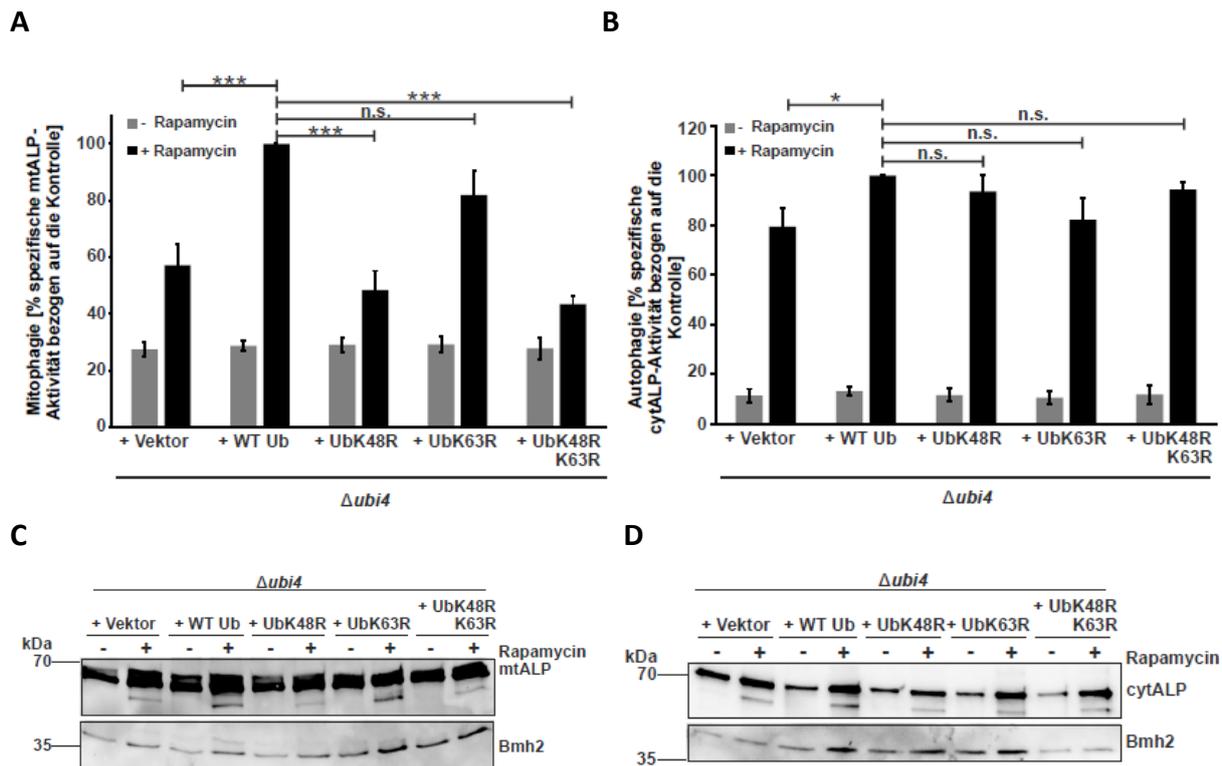


Abbildung 29: K48-verknüpfte Ubiquitinketten induzieren Mitophagie. **A und B**, Stämme, die die beschriebene Gendelektion und *PHO8* Knockout aufweisen und mtALP (A,C) oder cytALP (B,D) und den Leervektor (pKT10), Ubiquitin (WTUb) oder eine Ubiquitinmutante (UbK48R, UbK63R und UbK48R_K63R) exprimieren, wurden 24 Stunden mit 1 μ M Rapamycin behandelt oder unbehandelt belassen. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basiertem Assay quantifiziert und ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$), normiert auf *Δubi4* mit Wildtyp-Ubiquitin nach Rapamycin-Behandlung, angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). **C und D**, proteolytische Spaltung der mtALP (C) oder cytALP (D) wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Bmh2 diente als Ladekontrolle.

Mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurde die erfolgreiche Expression der unterschiedlichen Ubiquitin-Varianten validiert. Es zeigte sich zudem, dass im Vergleich zum Leervektor die Gesamtubiquitinierung von Proteinen stieg (Abb. 30). Nach Rapamycin-induzierter Mitophagie nahm der Anteil an Polyubiquitinierungen mit Wildtyp-Ubiquitin zu, jedoch nicht in den drei Ubiquitin-Mutanten (UbK48R, UbK63R und UbK48R_K63R). Die Stagnierung der Ubiquitinmenge in den Lysinmutanten entstand wahrscheinlich aufgrund des Erfordernisses dieser Lysinreste für die Bildung von Oligo- oder Polyubiquitinketten über K48 und K63.

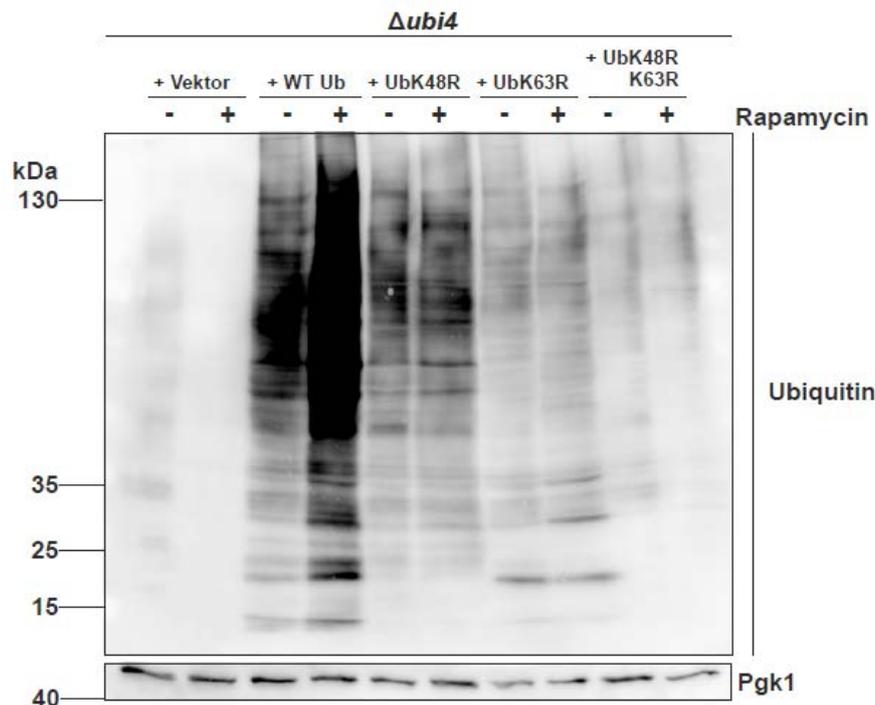


Abbildung 30: Ubiquitinmuster. Stämme, die die beschriebene Gendelektion aufweisen und mtALP plus den Leervektor (pKT10), Ubiquitin (WTUb) oder eine Ubiquitinmutante (UbK48R, UbK63R und UbK48R_K63R) exprimieren, wurden mit 1 μ M Rapamycin (0 oder 24 Stunden) behandelt. Das dargestellte Ubiquitinmuster wurde mittels Western Blot Analyse der Zellysate unter Verwendung des anti-Ubiquitin Antikörper detektiert. Pgk1 diente als Ladekontrolle.

3.2.5 Ubp3-bedingte Regulation der Mitophagie ist Ubi4-abhängig

Zuvor wurde bereits Ubp3 als negativer Regulator der Mitophagie und Ubi4 als erforderlich für die effektive Induktion der selektiven Eliminierung von Mitochondrien identifiziert. Daher wurde untersucht, ob eine funktionelle Verbindungen zwischen Ubi4 und der Deubiquitinase Ubp3 besteht. Hierfür wurde *UBP3* in *Δubi4* deletiert und der Level an Mitophagie und nicht-selektiver Autophagie nach Rapamycin-Behandlung mittels ALP-basiertem Assay quantifiziert. Die zusätzliche Deletion von *UBP3* führte zu keiner Steigerung der spezifischen mtALP-Aktivität oder proteolytischen Spaltung der mtALP (Abb. 31 A und C). Dieser Befund demonstriert, dass der Ubp3-abhängige Einfluss auf die Mitophagie abhängig von Ubi4 ist (Abb. 15 A und C, Abb. 16 A und C). Der *Δubi4* Stamm hatte wie zu erwarten keine signifikante Reduktion der nicht-selektiven Autophagie (Abb. 31 B und D). Jedoch zeigte die Doppelmutante *Δubi4 Δubp3* eine 50% reduzierte Autophagie im Vergleich zum WT. Dies entspricht ungefähr dem Effekt der alleinigen Deletion von *UBP3* (Vergleich Abb. 31 B und D mit 15 B und D, 16 B und D). Die Resultate zeigen, dass die Induktion des nicht-selektiven autophagischen Prozesses vermittelt durch die Deubiquitinase Ubp3 von der Präsenz von Ubi4

unabhängig ist und untermauern die Mitophagie-Spezifität des Polyubiquitin-kodierenden Gens *UBI4*.

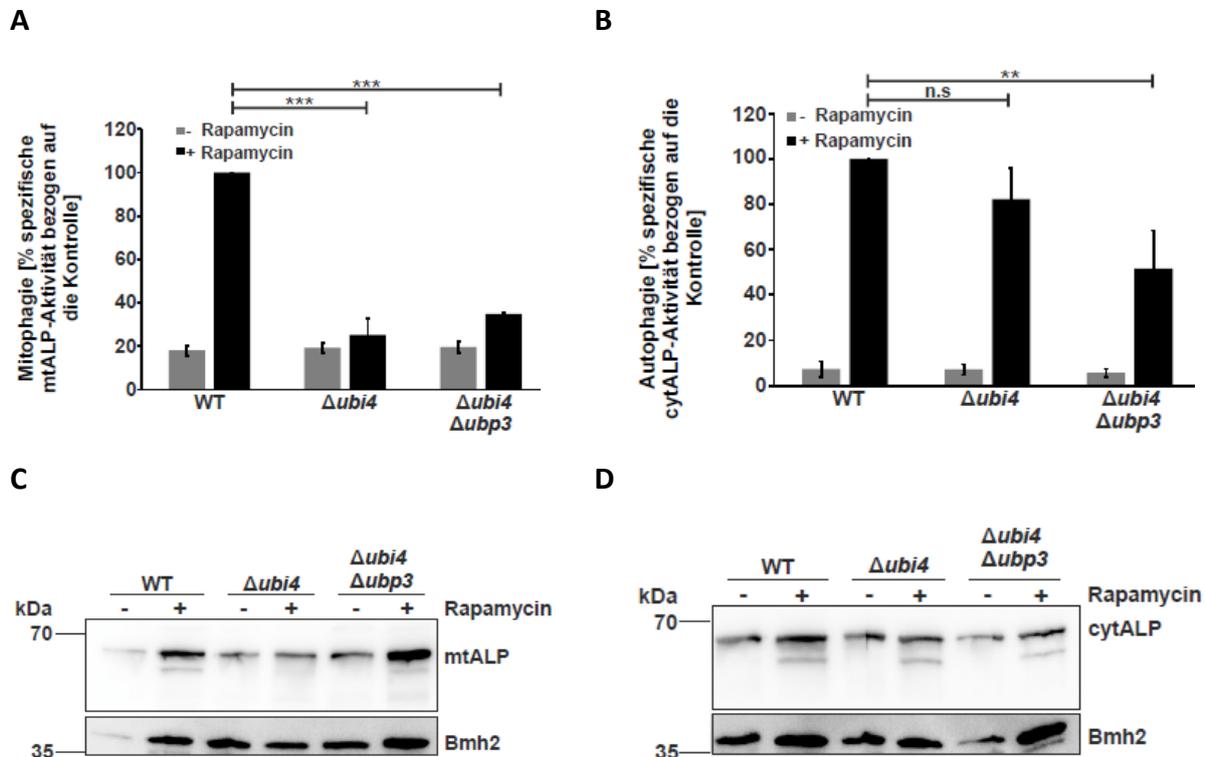


Abbildung 31: Ubp3 reguliert die Mitophagie in Abhängigkeit von Ubi4. A-D, Stämme, die die beschriebene Gendelektion und *PHO8* Knockout aufweisen und mtALP (A,C) oder cytALP (B,D) exprimieren, wurden mindestens 3 Tage in SG-Medium kultiviert und mit Rapamycin (0 oder 24 Stunden, 1 μ M) versetzt. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay quantifiziert und ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$), normiert auf Wildtyp nach Rapamycin-Behandlung, angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). **C und D**, proteolytische Spaltung der mtALP (C) oder cytALP (D) wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Bmh2 diente als Ladekontrolle.

3.2.6 Interaktion zwischen Ubi4 und der Rezeptor-vermittelten Mitophagie

Es konnte bereits demonstriert werden, dass die Regulation der Mitophagie durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex vom mitochondrialen Außenmembranprotein Atg32 abhängig ist und dadurch die Ubiquitin-vermittelte Mitophagie in Hefe mit der Rezeptor-vermittelten Mitophagie interagiert (Kapitel 3.1.4). Im Zuge dessen, sollte geklärt werden, ob diese Beobachtung auch auf Ubi4 zutrifft. Daher wurde in $\Delta ubi4$ eine Atg32-genspezifische Knockout-Kassette transformiert. Die Quantifizierung der Mitophagie-Aktivität erfolgte durch Anwendung des mtDHFR-GFP Assays, da die mtALP-Aktivität im $\Delta ubi4$ Stamm sehr niedrig war und mögliche Unterschiede zwischen der Singlemutante ($\Delta ubi4$) und der Doppelmutante

(*Δubi4 Δatg32*) schlecht messbar wären. Nach Kultivierung in SG-Medium und Rapamycin-Behandlung (0 oder 24 Stunden) wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse untersucht. Die Deletion von *ATG32* führte in allen Stämmen zu einem kompletten Block der Mitophagie (Abb. 32 A und B). *Δubi4* zeigte im Vergleich zum WT eine signifikante Reduktion von $\approx 60\%$. Das zusätzliche Fehlen von *ATG32* verstärkte diesen Effekt, so dass *Δubi4 Δatg32* eine kaum messbare Mitophagie-Aktivität aufwies. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *UBI4*-abhängige Effekt auf die Mitophagie abhängig vom mitochondrialen Rezeptor Atg32 ist.

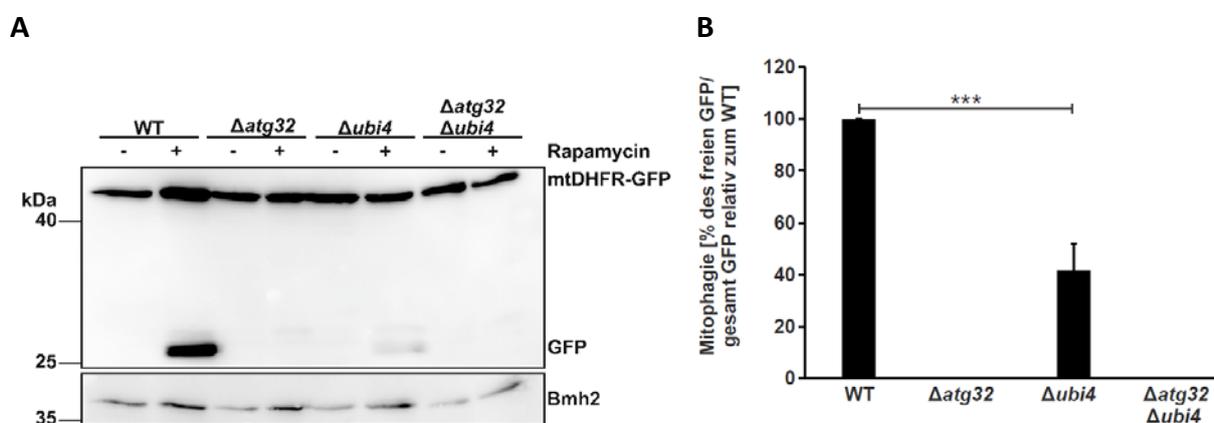


Abbildung 32: Aktivierung der Mitophagie durch Ubi4 ist Atg32-abhängig. **A**, Stämme, die die beschriebene Gendelektion aufweisen und mtDHFR-GFP exprimieren wurden 24 Stunden mit 1 μM Rapamycin behandelt oder unbehandelt belassen. Vakuoläres Schneiden des mito-GFP führt zur Akkumulation von freiem GFP, das mittels Western Blot Analyse des Zelllysats detektiert wurde. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot. Bmh2 diente als Ladekontrolle. **B**, Auswertung der Bandensignale mittels ImageJ. Angegeben ist der Mittelwert ($n \geq 3$) normiert zum Wildtyp. Die Signifikanz wurde durch t-Test (***) ($p \leq 0,001$) berechnet.

Der mitochondriale Rezeptor Atg32 ist für die Aktivierung der Mitophagie in Hefe essentiell und die Phosphorylierung am Serin 114 vermittelt diesen autophagischen Prozess (Aoki et al, 2011). Hier konnte demonstriert werden, dass die selektive Eliminierung von Mitochondrien vermittelt durch das Polyubiquitin-kodierende Gen *UBI4* von Atg32 abhängt. Um auszuschließen, dass die Inhibierung der Mitophagie im *Δubi4* Stamm aufgrund einer verminderten Atg32 Expression entstand, wurde die Menge an endogenem Atg32 überprüft. Die entsprechenden Stämme wurden in YPG-Medium kultiviert und 24 Stunden mit Rapamycin behandelt oder unbehandelt belassen. Unter normalen Wachstumsbedingungen (- Rapamycin) zeigte weder die Deletion von *UBI4* noch *Δubp3* einen verminderten Atg32 Menge (Abb. 33, - Rapamycin). Der Wildtyp wies verhältnismäßig äquivalente Mengen an

phosphorylierten (Pfeilspitze) zu unmodifiziertem Atg32 (Pfeil) auf und $\Delta ubp3$ zeigte eine starke Akkumulation an phosphoryliertem Atg32 (2:1 Verhältnis). Der Verlust von *UBI4* führte zu einer Reduktion an phosphoryliertem Atg32. Nach Rapamycin-induzierter Mitophagie wurde im $\Delta ubi4$ Stamm lediglich unmodifiziertes Atg32 detektiert (Abb. 33, + Rapamycin). Sowohl Wildtyp als auch die Deletion von *UBP3* führten zu einem gleichen Anteil an phosphorylierten zu unmodifizierten Atg32. Infolgedessen ist der Mitophagie-Defekt im $\Delta ubi4$ Stamm nicht auf eine Reduktion der Atg32 Proteinmenge zurückzuführen. Jedoch konnte mit diesem Experiment nicht geklärt werden, inwieweit Ubp3 und Ubi4 direkt einen Einfluss auf die Aktivität von Atg32 haben.

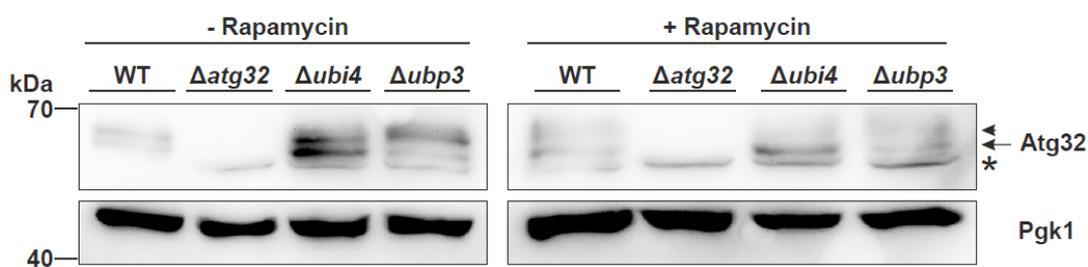


Abbildung 33: Endogenes Atg32 war nicht reduziert in $\Delta ubi4$ und $\Delta ubp3$. Stämme, die die angegebene Gendeletion aufweisen wurden 24 Stunden mit 1 μ M Rapamycin behandelt oder unbehandelt belassen. Die endogene Proteinmenge an Atg32 wurde mittels Western Blot Analyse des Zelllysats detektiert. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot. Pgk1 diente als Ladekontrolle. * = unspezifische Bande, Pfeilspitze entspricht dem phosphoryliertem Atg32 und der Pfeil stellt unmodifiziertes Atg32 dar.

3.2.7 Ubiquitinierung von Mitochondrien ändert sich dynamisch nach

Rapamycin-induzierter Mitophagie

Durch die bisherigen Resultate dieser Arbeit und durch eine früheren Studie (Müller et al, 2015) bestärkt, lag die Vermutung nahe, dass die Ubiquitinierung von mitochondrialen Außenmembranproteinen Mitophagie fördert und für sie essentiell ist. Daher wurde der Ubiquitinierungsstatus von mitochondrialen Proteinen im Wildtyp, und den Mutanten $\Delta ubi4$ und $\Delta ubp3$ analysiert. Die Stämme wurden in YPG-Medium kultiviert und anschließend 24 Stunden mit Rapamycin behandelt oder blieben unbehandelt. Aus den Zellen wurden Mitochondrien isoliert und über Saccharose-Gradienten aufgereinigt (Kapitel 2.11.2). Unter normalen Wachstumsbedingungen hatten beide Deletionsstämme $\Delta ubi4$ ($\approx 175\%$) und $\Delta ubp3$

($\approx 210\%$) einen höheren Anteil an ubiquitinierten Proteinen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 34 A und B).

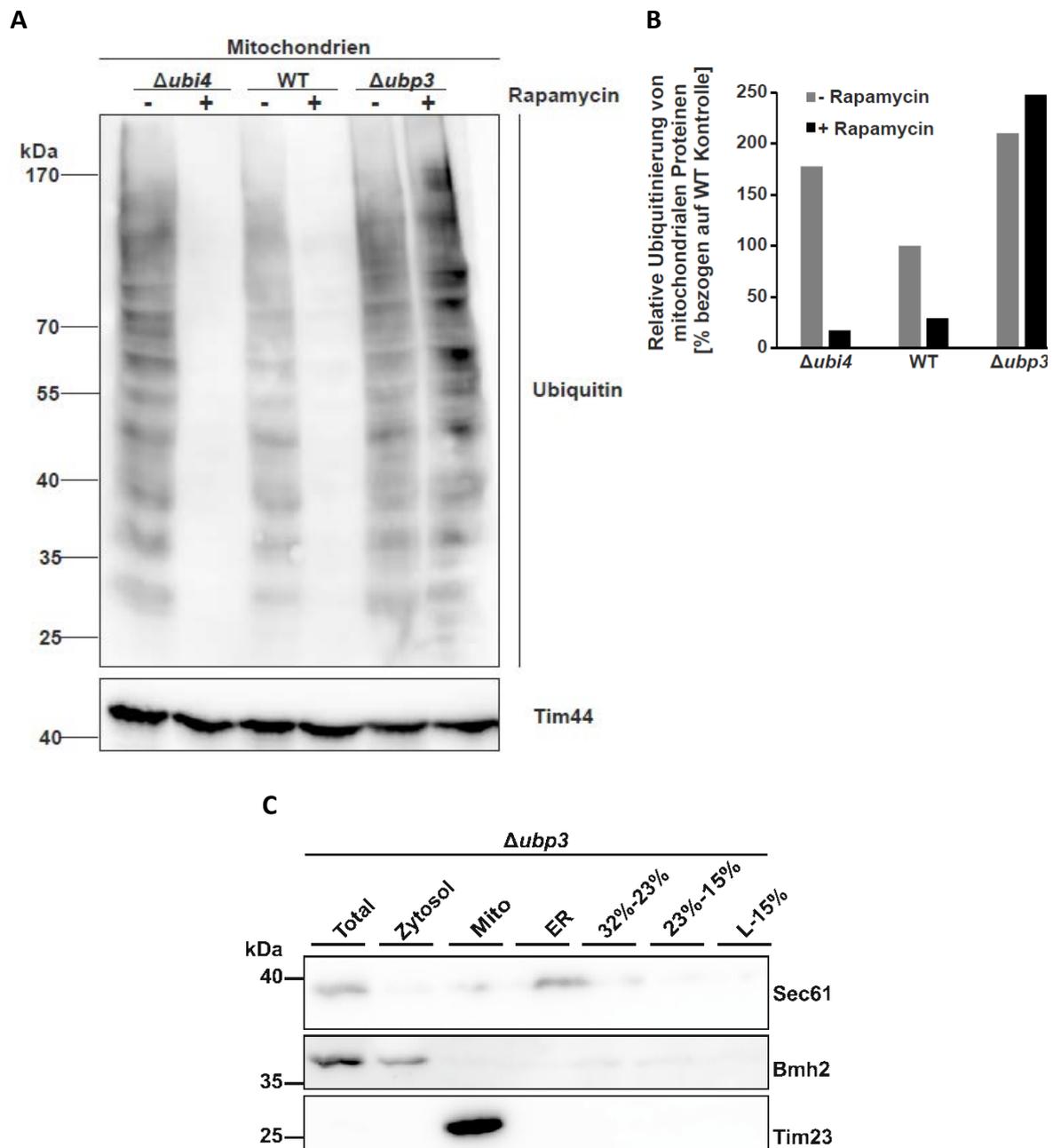


Abbildung 34: Die Ubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen ändert sich dynamisch nach Rapamycin-induzierter Mitophagie. **A**, Reine Mitochondrien wurden aus den angezeigten Stämmen nach Kultivierung in YPG-Medium für mindestens drei Generationen und anschließender Rapamycin-Behandlung ($1 \mu\text{M}$, 0 oder 24 Stunden) durch Saccharose-Gradient isoliert. Die Ubiquitinmenge wurde durch Western Blot Analyse unter Verwendung von anti-Ubiquitin Antikörper bestimmt. Tim44 diente als Ladekontrolle. **B**, Quantifizierung der relativen Ubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen mittels ImageJ. **C**, Die Reinheit der Mitochondrien in den jeweiligen Saccharose-Gradientenfractionen im $\Delta ubp3$ Stamm nach Rapamycin-Behandlung wurde durch Western Blot Analyse unter Verwendung der angegebenen zellulären Markerproteine analysiert. Äquivalente Proteinkonzentrationen der jeweiligen Fraktion wurden geladen. Bmh2, Tim23 und Sec61 dienten als Marker für das Zytosol, Mitochondrien (Mito) und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER).

Durch Rapamycin-induzierte Mitophagie nahm die Menge an Ubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen im Wildtyp (< 20%) und $\Delta ubi4$ (< 10%) stark ab und bei Zellen, denen *UBP3* fehlte, zu (fast 250%). Die Reinheit der Mitochondrienfraktion (Abb. 34 C, Mito) war im $\Delta ubp3$ Stamm sehr gut, sodass vorwiegend ubiquitinierte mitochondriale Proteine zur hohen Ubiquitinmenge nach Rapamycin-Behandlung beitrugen. Diese Daten legen nahe, dass die dynamische Deubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen abhängig von Ubp3 ist.

3.2.8 Ubi4 Vorläufer transloziert zu den Mitochondrien

Eine neue Studie bewies, dass die Phosphorylierung von mitochondrialem Polyubiquitin durch PINK1 eine Rolle bei der Rekrutierung des E3-Enzyms Parkin zu den Mitochondrien, sowie bei der Aktivierung der Ligase spielt (Shiba-Fukushima et al, 2014). Da in der Bäckerhefe *UBI4* das einzige Polyubiquitin-kodierende Gen ist, sollte analysiert werden, ob Ubi4 an die Mitochondrien transloziert. Für die zelluläre Lokalisierung wurde das C-terminale Fusionsprotein Ubi4-GFP verwendet und das GFP-Signal mikroskopisch oder biochemisch detektiert. Für die mikroskopische Analyse wurde der Stamm zusätzlich mit dem Plasmid pHS12-mitoDsRED transformiert. Die Kultivierung erfolgte in SG-Medium mit anschließender Rapamycin-Behandlung von 0, 1, 5 oder 24 Stunden.

Die Zellen wurden mit einer 2%igen niedrig schmelzenden Agarose-Lösung fixiert und mikroskopiert (Abb. 35 A). Der prozentuale Anteil an GFP-Signal in den Mitochondrien und Zytosol (Mito+ Zytosol) lag bei fast 100% (Abb. 35 B). Demnach lag Ubi4 unter normalen Wachstumsbedingungen sowohl im Zytosol, als auch in den Mitochondrien vor. Durch die Rapamycin-induzierte Mitophagie nahm dieser Anteil rapide ab, so dass das Fusionsprotein bereits nach einer Stunde zum Großteil (etwa 70%) und nach 24 Stunden fast ausschließlich zytosolisch lokalisiert war.

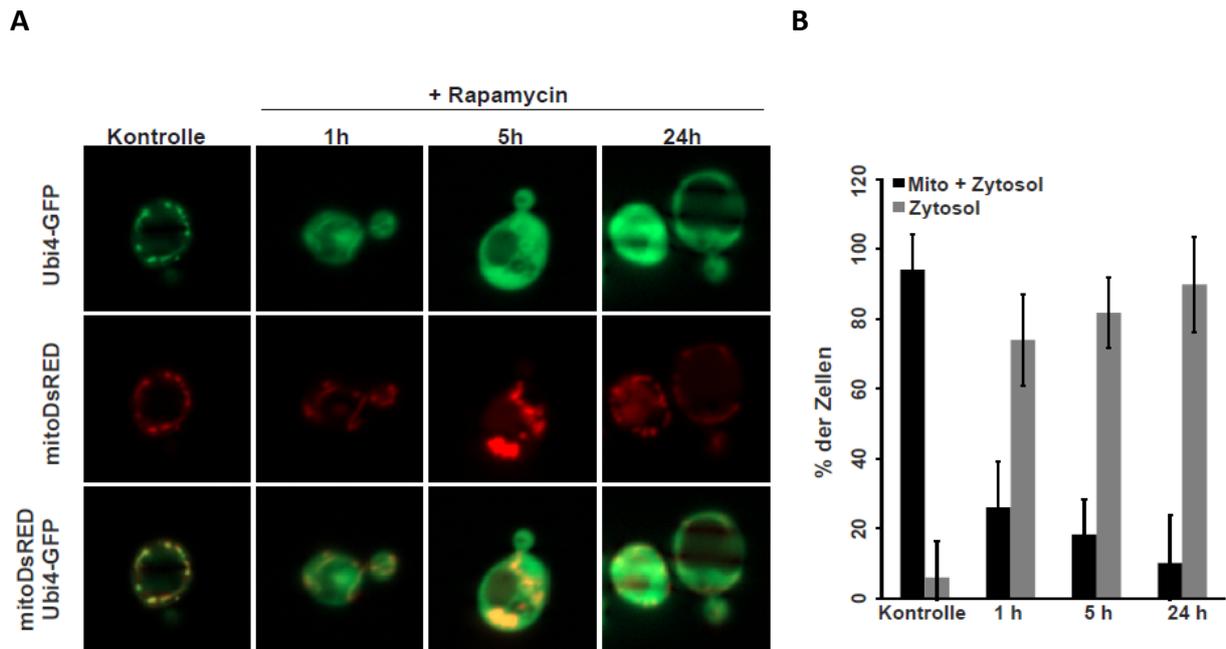


Abbildung 35: Der Ubi4 Vorläufer hatte eine mitochondriale Lokalisation. A und B, mitoDsRED exprimierende Stämme, welche C-terminales GFP-Fusionsprotein mit Ubi4 aufweisen, wurden per Fluoreszenzmikroskopie (A) analysiert. **A,** die Zellen wurden mit Rapamycin für 0, 1, 5 oder 24 Stunden behandelt, geerntet und mikroskopiert. Repräsentative Bilder sind dargestellt. **B,** mehr als 50 Zellen wurden in je drei unabhängigen Versuchen gezählt und der prozentuale Anteil an GFP-Signal nur im Zytosol oder Mitochondrien und Zytosol (Mito+Zytosol) wurde ermittelt.

Bislang wurde noch keine Deubiquitinase identifiziert, die die Ubi4-Vorstufe schneidet und freie Ubiquitin-Moleküle von der Polyubiquitinkette entlässt. Da es sich bei Ubp3 um eine Ubiquitin-spezifische Protease handelt mit Bre5 als Co-Faktor wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex die Ubi4-Vorstufe schneidet und dadurch die Mitophagie inhibiert. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden im Ubi4-GFP-Stamm *UBP3* oder *BRE5* deletiert und die neu generierten Stämme analysiert.

Die Deletion von *UBP3* oder *BRE5* hatte keine gravierenden Auswirkungen auf die dynamische Translokation von Ubi4-GFP von den Mitochondrien zum Zytosol (Vergleich Abb. 35 und 36). Lediglich unter normalen Wachstumsbedingungen war der zytosolische Anteil an GFP-Signal in den Mutanten erhöht (Abb. 36 B und D).

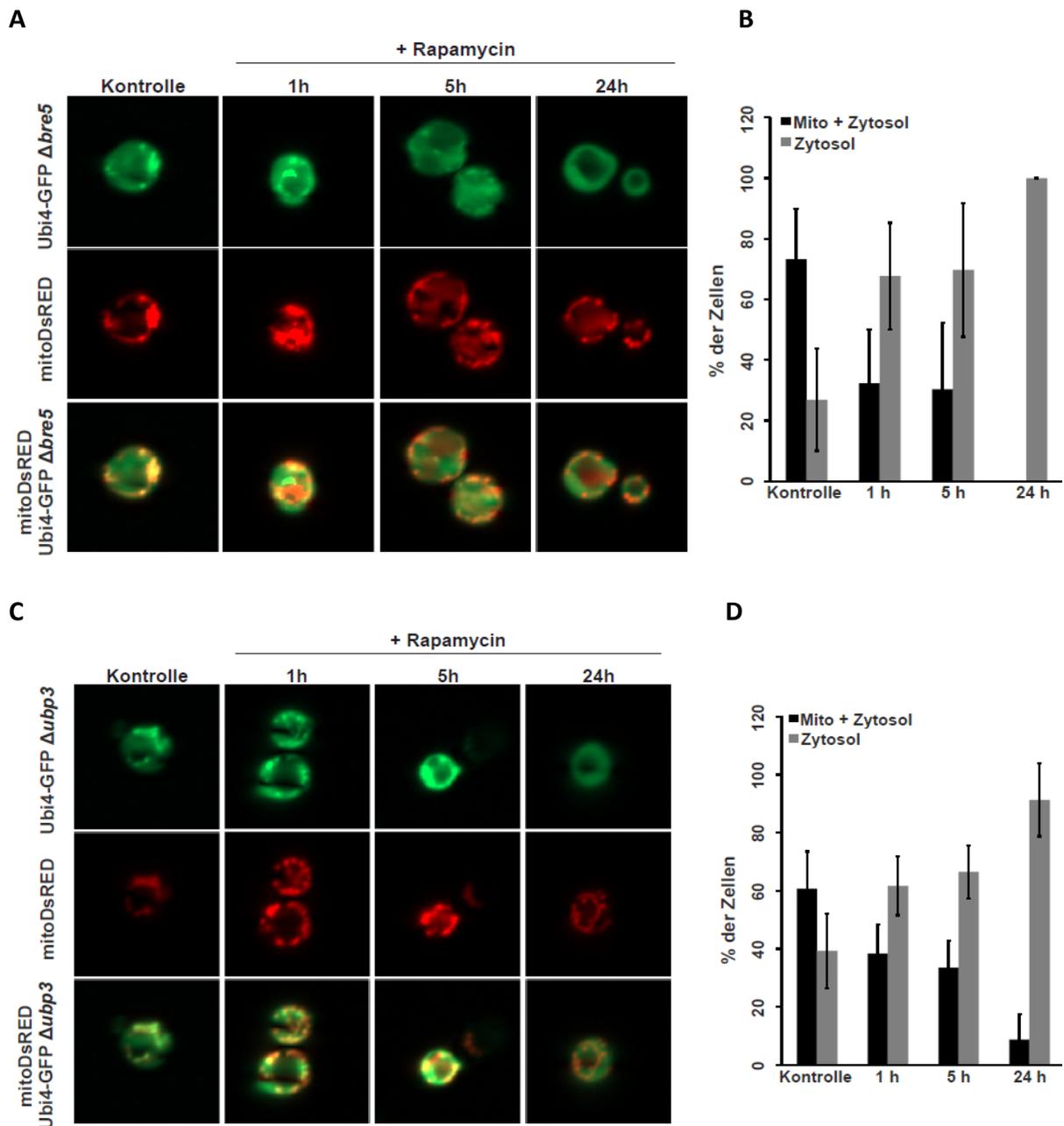


Abbildung 36: Dynamische Translokation des Ubi4-GFPs in Abhängigkeit von Bre5 oder Ubp3. A-D, mitoDsRED exprimierende Stämme, welche C-terminales GFP-Fusionsprotein mit Ubi4 und Deletion von *BRE5* (A und B) oder *UBP3* (C und D) aufweisen, wurden per Fluoreszenzmikroskopie (A) oder Western Blot Analyse (E und F) untersucht. **A und C**, die Zellen wurden mit Rapamycin für 0, 1, 5 oder 24 Stunden behandelt. Repräsentative Bilder sind dargestellt. **B und D**, >50 Zellen wurden in je 3 unabhängigen Tests gezählt und der prozentuale Anteil an GFP-Signal nur im Zytosol oder Mitochondrien und Zytosol (Mito+Zytosol) ermittelt.

Die SDS-PAGE und Western Blot Analyse der Stämme demonstrierte eine mitochondriale Lokalisation des Ubi4-GFP-Vorläufers unabhängig von *UBP3* oder *BRE5*, sowie eine Prozessierung des Ubi4-GFP-Vorläufers (Abb. 37 A). Durch die Rapamycin-induziert Mitophagie stieg der Anteil an Ubi4-GFP Vorläufersignal in Hefezellen, denen *UBP3* oder *BRE5*

fehlte deutlich an (Abb. 37 A und B). Diese Beobachtung legt nahe, dass in Abwesenheit des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes Ubi4-GFP nicht effizient an den Mitochondrien geschnitten wird, so dass der Anteil an Vorläuferprotein steigt.

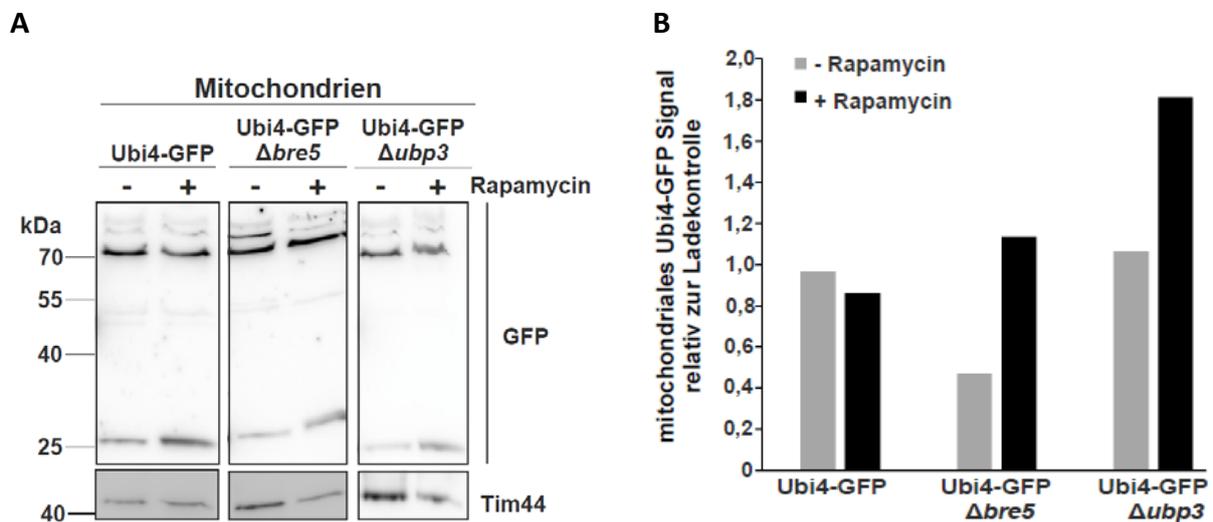


Abbildung 37: Ubi4-GFP Vorläufer Signals in den Mitochondrien. **A**, Mitochondrien von mitoDsRED exprimierenden Stämmen mit beschriebener Gendeletion, welche C-terminales GFP-Fusionsprotein mit Ubi4 aufweisen, wurden nach 0 oder 24 Stunden Rapamycin-Behandlung isoliert. Mittels Western Blot Analyse durch Verwendung eines anti-GFP Antikörpers wurde die subzelluläre Lokalisation von Ubi4-GFP bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Blots. Protein Tim44 diene als Ladekontrolle. **B**, Dargestellt ist die Quantifizierung des mitochondrialen Ubi4-GFP-Signals in der Mitochondrienfraktion (A) bezogen auf die Ladekontrolle Tim44.

3.3 Die Abhängigkeit der Mitophagie vom mitochondrialen Außenmembranprotein Fzo1

3.3.1 Ubiquitinierung von Fzo1 ist relevant für die Mitophagie

Bislang sind in der Bäckerhefe nur wenige ubiquitinierte mitochondriale Außenmembranproteine bekannt. Fzo1, das für die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran entscheidend ist, gehört zu dieser Gruppe. Durch die Identifikation des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes, der Mitophagie inhibiert, und dem Polyubiquitin Ubi4, das Mitophagie induziert, lag die Frage nahe, ob Fzo1 ein mögliches Substrat ist. Für die Analyse musste die Doppelmutante $\Delta dnm1 \Delta fzo1$ verwendet werden. Diese Vorgehensweise war nötig, da die

Deletion von lediglich *FZO1* einen schnellen Verlust der mitochondrialen DNA und einen Wachstumsdefekt unter respiratorischen Konditionen verursacht (Koshiba et al, 2004). Dieser Effekt wird nachweislich durch eine zusätzliche Deletion von *DNM1*, essentiell für die mitochondriale Fission, kompensiert (Jensen et al, 2000; Sesaki & Jensen, 1999).

Nach Ausschalten des *FZO1* Gens im $\Delta dnm1 \Delta pho8$ Stamm und Integration der jeweiligen alkalischen Phosphatase wurde der Stamm mit der entsprechenden Kontrolle ($\Delta dnm1 \Delta pho8$) in SG-Medium für mehrere Generationen kultiviert und mit Rapamycin (1 μ M, 0 oder 24 Stunden) behandelt. Die Quantifizierung der Mitophagie-Aktivität durch den ALP-basierten Assay demonstrierte, dass $\Delta dnm1 \Delta fzo1$ eine drastische Reduktion auf $\approx 30\%$ verglichen mit der Kontrolle ($\Delta dnm1$), aufwies (Abb. 38 A). Die nicht-selektive Autophagie war in der Mehrfachdeletion der Fusion und Fission nur minimal verringert auf $\approx 73\%$ (Abb. 38 B). Die Befunde legen nahe, dass das Außenmembranprotein Fzo1 für eine effiziente Mitophagie-Aktivität notwendig ist und möglicherweise ein gesuchtes Substrat darstellt.

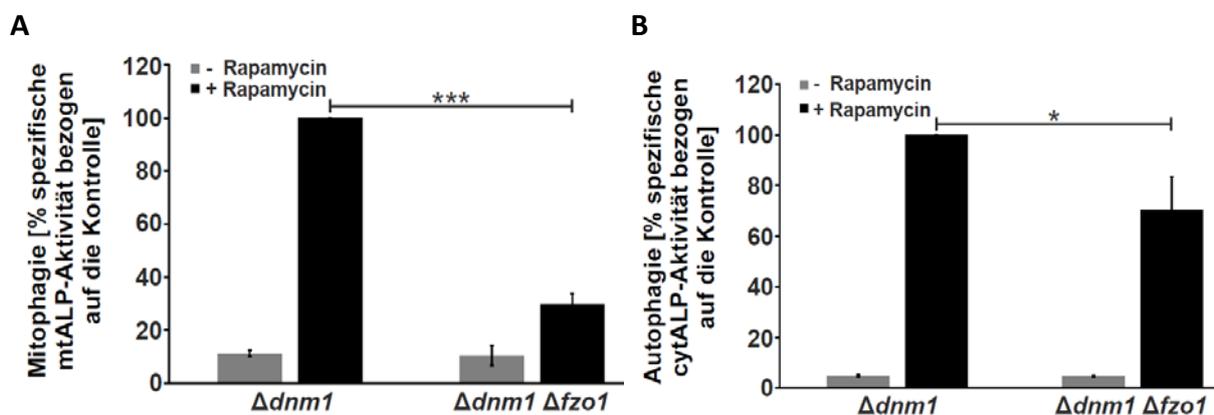


Abbildung 38: Das mitochondriale Außenmembranprotein Fzo1 ist notwendig für die Mitophagie. A und B, Stämme mit beschriebener Gendeletion und Deletion des endogenen *PHO8*, die mtALP (A) oder cytoALP (B) exprimieren, wurden in SG-Medium kultiviert und für 24 Stunden mit 1 μ M Rapamycin behandelt oder blieben unbehandelt. Die spezifische ALP-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay ermittelt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) normiert auf die Rapamycin-behandelte Kontrolle ($\Delta dnm1$) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Zur Verifikation der Ergebnisse wurde ein weiteres Verfahren zur Analyse der Mitophagie verwendet. Zu diesem Zweck wurde der mtDHFR-GFP-Assay eingesetzt. Bei dieser Methode spiegelt der Anteil an freiem GFP den Grad an Mitophagie wieder, da nur nach Induktion dieses Prozesses das mtDHFR-GFP in der Vakuole gespalten wird. Die Stämme $\Delta dnm1 \Delta fzo1$, $\Delta dnm1$ (als Positivkontrolle) und $\Delta atg32$ (als Negativkontrolle) wurden mit dem Plasmid

pRS316-mtDHFR-GFP transformiert. Die Kultivierung und Induktion der Mitophagie erfolgte wie zuvor beim ALP-basierendem Verfahren. Die Positivkontrolle zeigte eine starke Ansammlung von freiem GFP nach Rapamycin-Behandlung, die wie zu erwarten in der Negativkontrolle ausblieb. Im Vergleich mit $\Delta dnm1$ zeigte $\Delta dnm1 \Delta fzo1$ eine geringe GFP-Akkumulation (Abb. 39 A). Die Quantifizierung der Bandenintensität zeigte deutlich, dass die Mitophagie-Aktivität auf ungefähr 30 % verringert war (Abb. 39 B) und spiegelt gut die Resultate des ALP-basierendem Assays wieder.

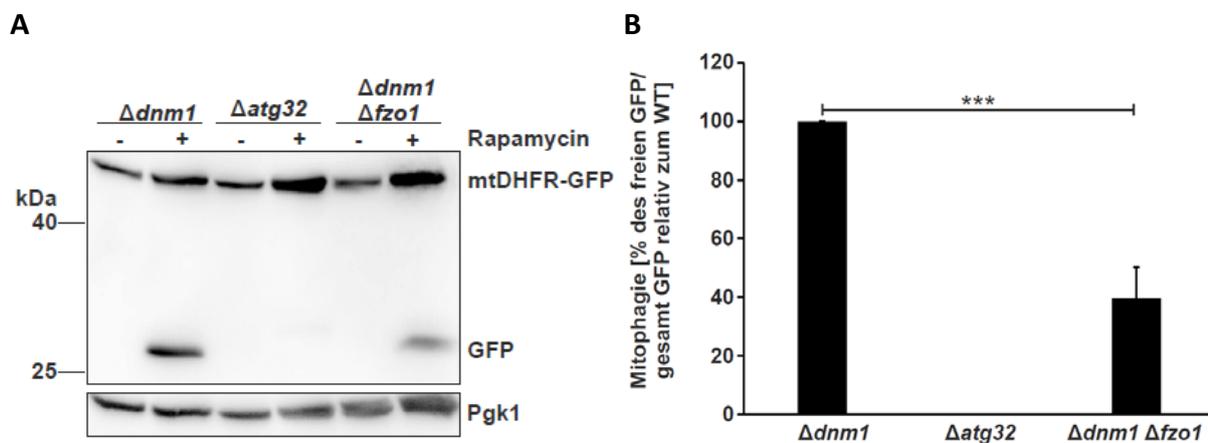


Abbildung 39: FZO1 Deletion führt zur Reduktion der GFP-Akkumulation nach Rapamycin-induzierter Mitophagie. **A**, Stämme, denen endogenes *PHO8* fehlt und die die angegebene Gendeletion aufweisen, wurden mit dem Plasmid pRS316-Su9-mtDHFR-GFP transformiert. Die Kultivierung erfolgte in SG-Medium mit anschließender Rapamycin-Behandlung (1 μ M, 24 Stunden) oder die Stämme blieben unbehandelt. Vakuoläres Schneiden des mito-GFP führt zur Akkumulation von freiem GFP, das mittels Western Blot Analyse des Zelllysats detektiert wurde. Dargestellt ist ein Beispiel-Blot. Pgk1 diene als Ladekontrolle. **B**, Auswertung der Bandensignale mittels ImageJ. Angegeben ist der Mittelwert (n \geq 3) normiert zur Positivkontrolle ($\Delta dnm1$). Die Signifikanz wurde durch t-Test (***: p \leq 0,001) berechnet.

Zur Bestätigung, dass die Inhibierung der Mitophagie direkt von Fzo1 verursacht wurde, wurde die Gendeletion komplementiert. Der $\Delta dnm1 \Delta fzo1$ Stamm wurde hierfür mit einem Plasmid, das Fzo1 unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert, transformiert und anschließend die spezifische mtALP-Aktivität gemessen. Der Deletionsstamm $\Delta dnm1 \Delta fzo1$ zeigte im Vergleich zur Kontrolle ($\Delta dnm1$) eine deutliche Reduktion des selektiven mitochondrialen Abbaus (Abb. 40 A und B). Dieser Mitophagie-Defekt konnte durch die Expression von Fzo1 komplementiert werden. Die proteolytische Spaltung des mtALPs bestätigte den Einfluss von Fzo1 auf die selektive Eliminierung von Mitochondrien (Abb. 40 B). Die Detektion der Fzo1 Proteinmenge mittels anti-Fzo1 Antikörper zeigte, dass dieser im

komplementierten Stamm ($\Delta dnm1 \Delta fzo1 + Fzo1$) vergleichbar mit dem im $\Delta dnm1$ Stamm (Abb. 40 B) war. Demnach ist die Präsenz von Fzo1 für die Vermittlung der Mitophagie notwendig.

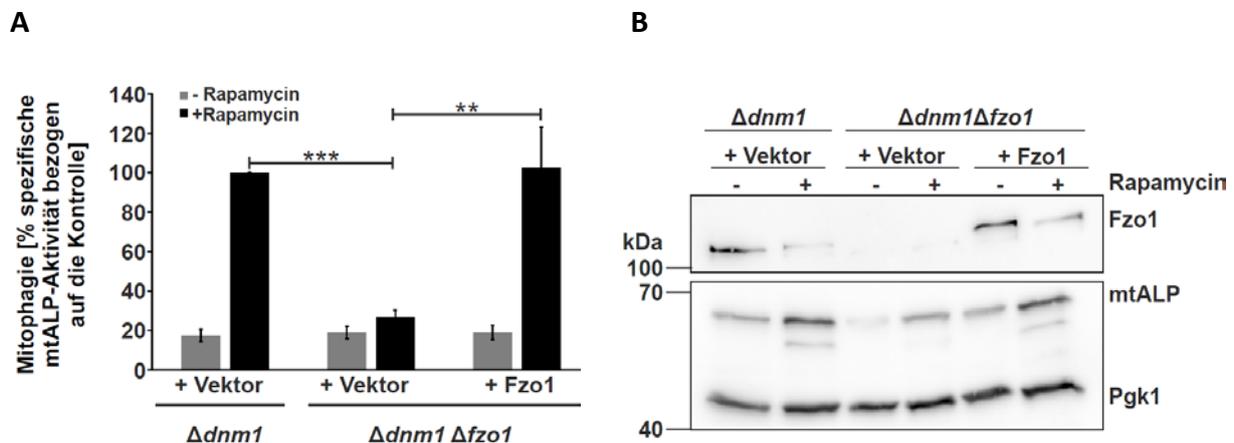
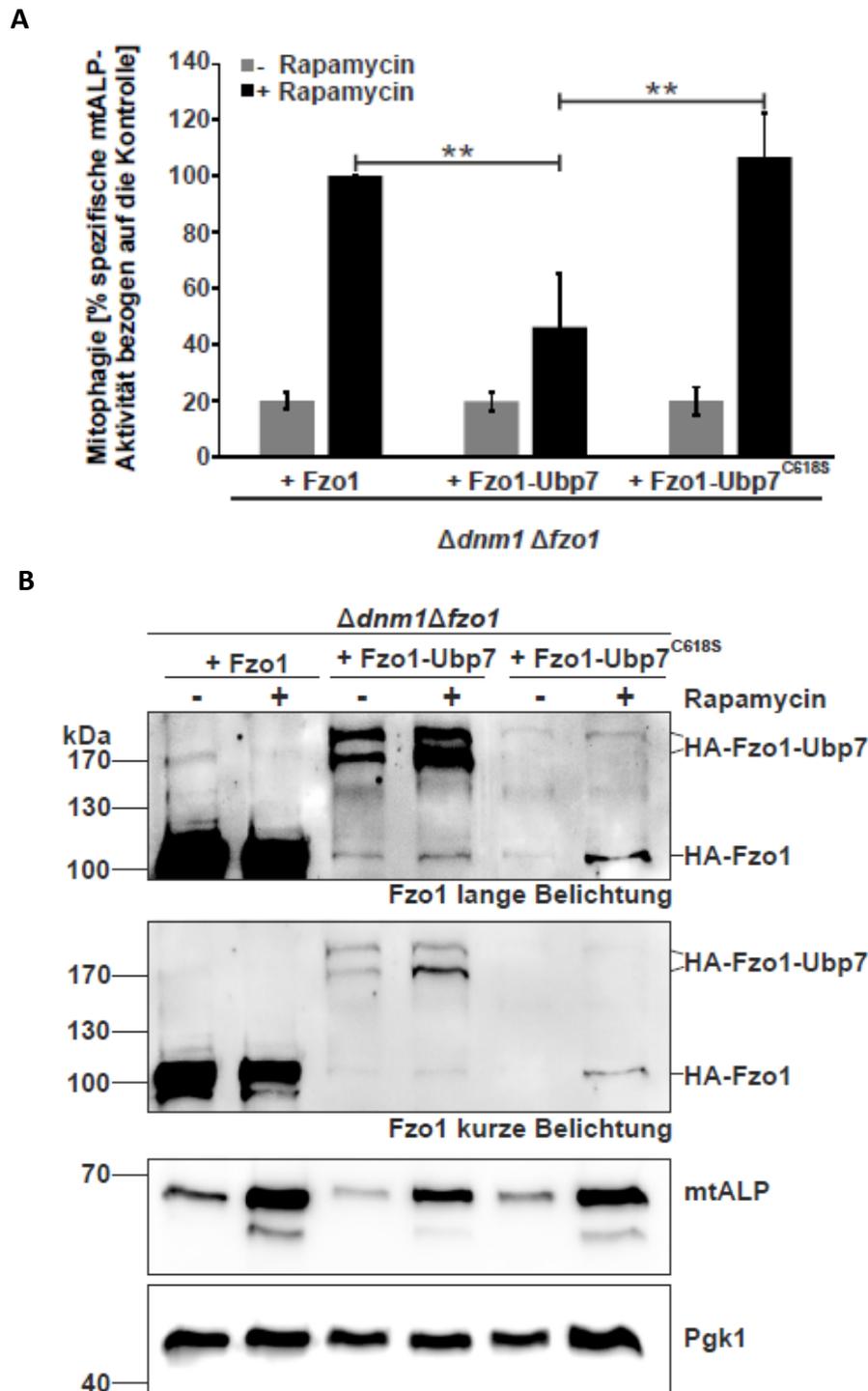


Abbildung 40: Mitophagie-Inhibierung ist direkt auf Fzo1 zurückzuführen. **A**, Stämme, denen endogenes *PHO8* und *DNM1* oder *DNM1* und *FZO1* fehlen, wurden mit den Plasmiden pXY242mtALP und pRS316-Fzo1 oder dem Leervektor (pRS316) transformiert. Die spezifische mtALP-Aktivität wurde mittels ALP-basiertem Assay nach Rapamycin-Behandlung (0 oder 24 Stunden) bestimmt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n \geq 3$) angegeben. Normiert wurde auf $\Delta dnm1$ nach Rapamycin-Behandlung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (**: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). **B**, proteolytische Spaltung der mtALP wurde mittels Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Fzo1 wurde mit einem anti-Fzo1 Antikörper detektiert. Pgk1 diente als Ladekontrolle.

3.3.2 Ubiquitinierung von Fzo1 an Lysin 464 fördert die Mitophagie

Nachdem Fzo1 als relevant für die Induktion der Mitophagie identifiziert wurde, war noch unklar, ob direkt die Ubiquitinierung von Fzo1 zur Aktivierung des selektiven Abbaus von Mitochondrien benötigt wird. Um diesen Ansatz zu testen, wurde ein bereits dokumentiertes Fusionsprotein (Anton et al, 2013), in dem Fzo1 an seinem C-Terminus mit der Deubiquitinase Ubp7 (Fzo1-Ubp7) oder mit der katalytisch inaktiven Variante (Fzo1-Ubp7^{C618S}) fusioniert ist, eingesetzt. Durch die Verknüpfung mit dem aktiven Enzym Ubp7 wird Fzo1 effizient von Ubiquitin-Molekülen entfernt (Anton et al, 2013). Nach Rapamycin-induzierter Mitophagie wurde für das Fusionsprotein Fzo1-Ubp7 eine um etwa 50% reduzierte mtALP-Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle (Fzo1) gemessen (Abb. 41 A und B). Die Inaktivierung der Deubiquitinase (Fzo1-Ubp7^{C618S}) führte dazu, dass die Aktivität vollständig wiederhergestellt wurde.



Die proteolytische Spaltung der mtALP wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert und stimmt mit den gemessenen spezifischen mtALP-Aktivitäten überein (Abb. 41 B). Der Fzo1 Proteinmenge war in der Fzo1-Ubp7^{C618S} Mutante verglichen zur Positivkontrolle zwar reduziert, aber ausreichend um die Mitophagie-Aktivität zu verbessern (Abb. 41 B, anti-HA und anti-Fzo1). Diese Beobachtung deutet stark darauf hin, dass die Deubiquitinierung des mitochondrialen Außenmembranproteins Fzo1 die Mitophagie deutlich hemmt.

Fzo1 verfügt über mehrere Lysin-Reste, die ubiquitiniert werden können. Im Weiteren sollte daher geklärt werden welcher Lysin-Rest in Fzo1 verantwortlich für die Mitophagie-Aktivität ist. Deswegen wurden weitere Fzo1-Varianten, in denen unterschiedliche Lysine durch Arginin ausgetauscht waren, analysiert. Darunter Fzo1-K398R (Lysin der Position 398 modifiziert), Fzo1-K464R (Lysin der Position 464 modifiziert) und Fzo1-K398R_K464R (Lysine der Position 398 und 464 modifiziert).

Nur die Mutante Fzo1-K398R zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle (Fzo1) eine vollständige Induktion der Mitophagie (Abb. 42 A und B). Durch Modifikation des Lysins der Position 464 in Fzo1, alleine oder in Kombination mit weiteren Lysinmutationen, reduzierte sich die Mitophagie-Aktivität auf ≈60%. Die zwei Fzo1-Mutanten (K464R und K383R_K464R) führten darüber hinaus zu einer vermehrten Ansammlung von unmodifiziertem Mitofusin (Abb. 42 B). Dies deutet darauf hin, dass das mitochondriale Außenmembranprotein Fzo1 stabilisiert wird. Zusammenfassend demonstrieren diese Resultate, dass die Ubiquitinierung von Fzo1 an der Position 464 entscheidend für die Vermittlung der Rapamycin-induzierten Mitophagie ist.

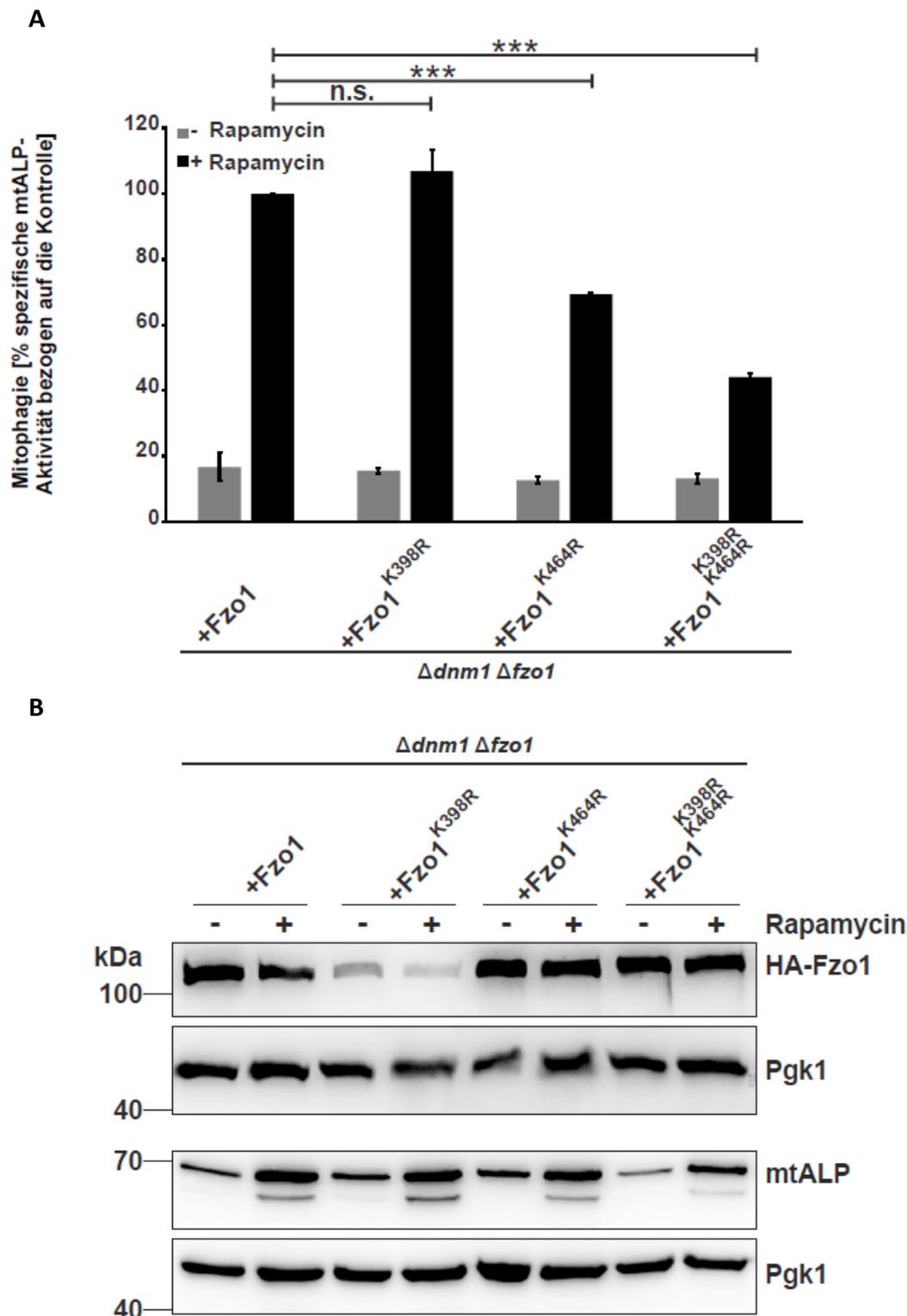


Abbildung 42: Ubiquitinierung des Lysin-Rests an Position 464 vermittelt Mitophagie. **A**, Stämme, denen endogenes *PHO8* und beschriebenes Gen fehlt, wurden mit pXY242mtALP und pRS316-HA-Fzo1, pRS316-HA-Fzo1^{K398R}, pRS316-HA-Fzo1^{K464R} oder pRS316-HA-Fzo1^{K398R_K464R} transformiert. Die spezifische mtALP-Aktivität wurde mittels ALP-basiertem Assay nach 24 Stunden Rapamycin-Behandlung bzw. unbehandelt in SG Medium bestimmt. Die spezifische Aktivität ist als Mittelwert mit Standardabweichung (n≥3) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (n.s.: p > 0,05;***: p < 0,001). **B**, proteolytische Spaltung der mtALP wurde mittels Western Blot Analyse der Zellextrakte bestimmt. Fzo1 wurde mit einem anti-HA Antikörper detektiert. Pgk1 diente als Ladekontrolle.

3.3.3 Mitophagie ist unabhängig von der mitochondrialen

Außenmembranfusion

Eine essentielle Funktion des Proteins Fzo1 ist die mitochondriale Außenmembranfusion. Dieser zelluläre Prozess erfolgt in mehreren einander folgenden Schritten. Durch die *cis*-Assoziation von Fzo1 auf der gleichen Außenmembran entstehen Dimere, die wiederum durch *trans*-Assoziation von gegenüberliegenden Membranen fusionieren. Durch nachfolgende Ubiquitinierungen von Fzo1 an unterschiedlichen Lysinen fusioniert die mitochondriale Außenmembran (Abb. 43). Folglich führt die Mutation von *FZO1* zu einem Defekt der mitochondrialen Fusion.

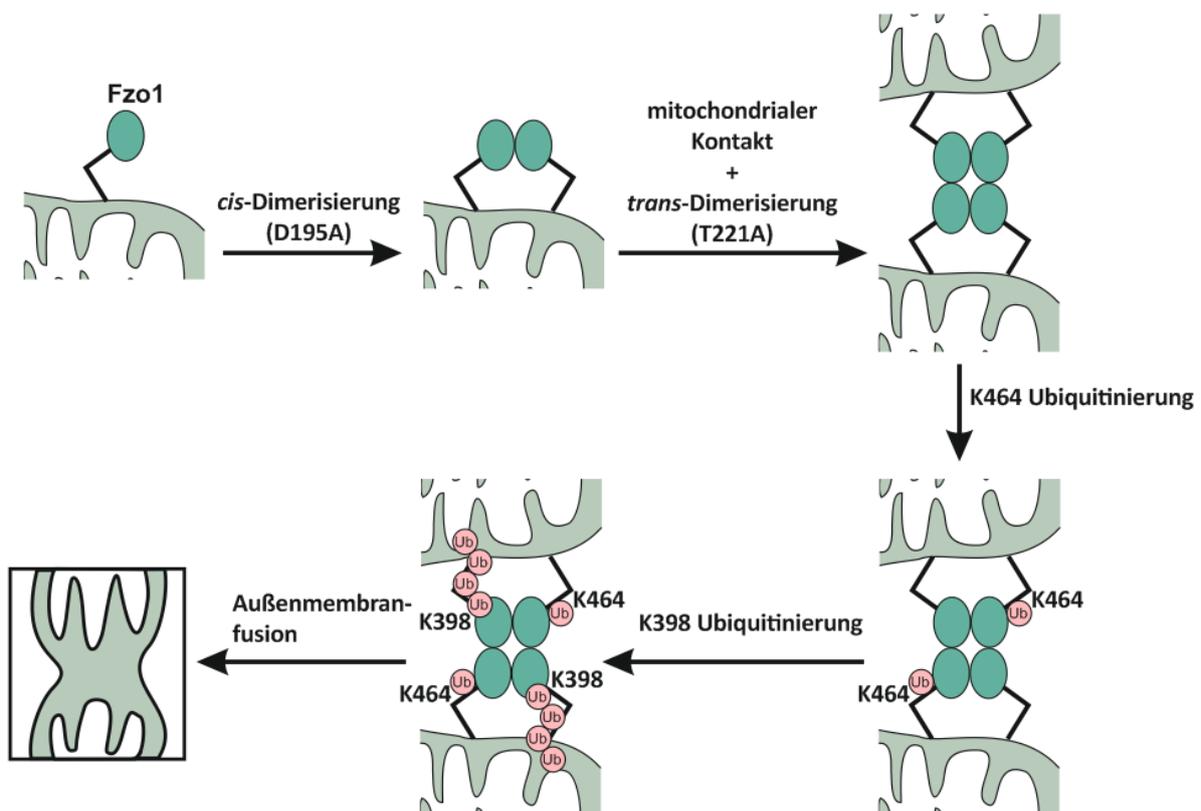


Abbildung 43: Intermolekulare Ubiquitinierung von Fzo1 und mitochondriale Außenmembranfusion.

Die GFP-Bindung an der GTPase-Domäne von Fzo1 an Position 195 fördert die *cis*-Dimerisierung. Die *trans*-Dimerisierung von zwei Fzo1 Proteinen an Position 221 bei der Anbindung von zwei Mitochondrien löst wahrscheinlich eine Konformationsänderung in Fzo1 aus. Dies hat eine Ubiquitinierung von Fzo1 am Lysin 464 zur Folge. Diese Modifikation induziert die Bildung von Ubiquitinketten an K398 eines benachbarten Fzo1-Moleküls, das die Außenmembranfusion fördert.

Um auszuschließen, dass die Reduktion der Mitophagie-Aktivität von $\Delta fzo1$ aufgrund eines Fusionsdefekts entstand, wurden Fzo1-Fusionsmutanten auf ihre Fähigkeit zur Induktion des selektiven Abbaus von Mitochondrien analysiert. $\Delta fzo1$ Stämme, die Fzo1 synthetisieren, das

einen Defekt in der *cis* (D195A)- oder *trans* (T221A)-Dimerisierung aufweisen, sowie entsprechende Kontrollen, wurden in SG-Medium kultiviert. Die selektive Eliminierung von Mitochondrien wurde durch Rapamycin-Behandlung induziert und mittels ALP-basierendem Assay quantifiziert. Durch Expression von Fzo1 oder Fzo1^{T221A} wurde der Mitophagie-Defekt komplementiert (Abb. 44). Die Synthese der Mutante Fzo1^{D195A} führte lediglich zu einer teilweisen Verbesserung der Mitophagie-Aktivität im Vergleich zu $\Delta fzo1$. Folglich resultiert eine generelle Beeinträchtigung der mitochondrialen Außenmembranfusion zu keinem Mitophagie-Defekt. Jedoch scheint die Fzo1-Homodimerisierung durch *cis*-Assoziation wichtig für die effektive Aktivierung der Mitophagie in Bäckerhefe zu sein.

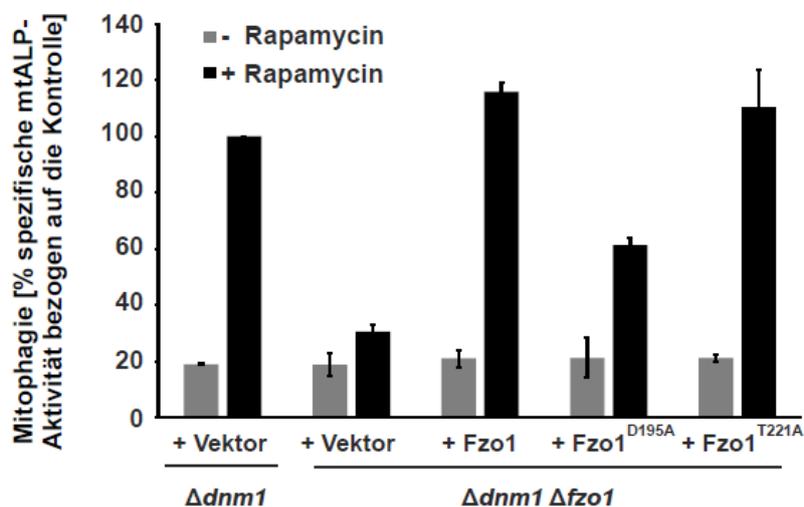


Abbildung 44: Mitophagie ist nicht fusionsabhängig. A, Stämme, denen endogenes *PHO8* und beschriebenes Gen(e) fehlt, wurden mit den Plasmiden pXY242mtALP und pRS315 (Leervektor), pRS316-HA-Fzo1, pRS316-HA-Fzo1^{D195A}, oder pRS316-HA-Fzo1^{T221A} transformiert. Die spezifische mtALP-Aktivität wurde mittels ALP-basierendem Assay nach 24 Stunden Rapamycin-Behandlung bzw. unbehandelt in SG Medium bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert mit Abweichungen (n=2) normiert auf $\Delta dnm1$ mit Leervektor.

3.3.4 Ubiquitinierungsstatus von Fzo1

Die bisherigen Daten zeigten, dass das Polyubiquitin Ubi4 die Mitophagie vermittelt und der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex diesen autophagischen Prozess inhibiert. Die Frage war noch offen, ob diese Regulation des selektiven Abbaus von Mitochondrien durch Beeinflussung des Ubiquitinierungsstatus von Fzo1 erfolgt, da demonstriert werden konnte, dass die Ubiquitinierung von Fzo1 für eine effektive Aktivierung der Mitophagie benötigt wird.

Aus diesem Grund wurde der Ubiquitinierungsstatus von Fzo1 im $\Delta ubp3$ und $\Delta ubi4$ Stamm, die HA-Fzo1 exprimieren, nach Rapamycin-Behandlung analysiert. Für die Detektion wurde eine grobe Mitochondrienpräparation mit anschließender Immunopräzipitation (IP) (Kapitel 2.9.5) durchgeführt. Der Input und die IPs wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

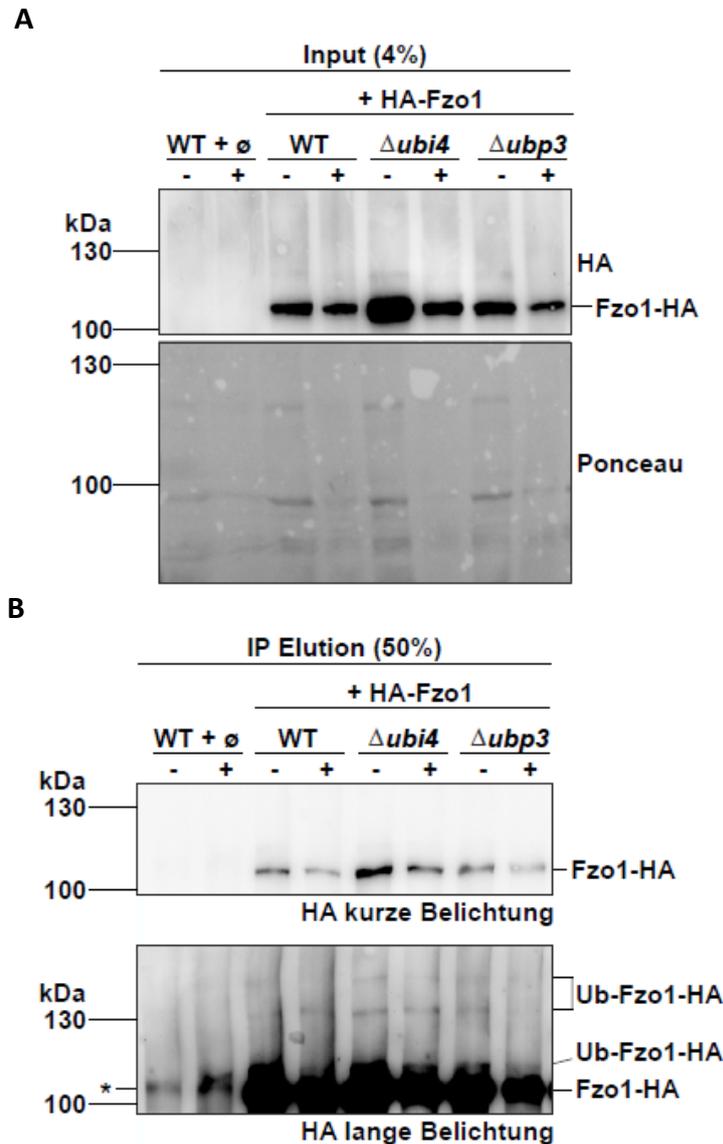


Abbildung 45: Ubiquitinierungsstatus von Fzo1 in den angegebenen Stämmen. A und B Stämme, denen beschriebenes Gen fehlt, wurden mit pRS316-HA-Fzo1 oder dem Leervektor (pRS316) transformiert. Die Kultivierung erfolgte in SG-Medium für mindestens drei Tage mit anschließender Rapamycin-Behandlung (1 μ M, 0 oder 24 Stunden). 140 OD wurden geerntet, Mitochondrien isoliert und nach Lyse der Mitochondrien eine Immunopräzipitation durchgeführt. 4% des Inputs (A) oder 50% der Eluate (B) wurden aufgetragen. Fzo1 wurde mittels anti-HA Antikörper detektiert. Die Kennzeichnung Ub-Fzo1-HA stellt die ubiquitinierten Formen von Fzo1 dar, wobei Fzo1-HA das unmodifizierte Protein symbolisiert. Der Stern repräsentiert eine unspezifische Bande.

Durch Verwendung eines anti-HA Antikörpers konnte das unmodifizierte Fzo1 (Abb. 45 B, Fzo1 (kurze Belichtung)) und verschiedene, ubiquitinierte Formen (Abb. 45 B, Ub-Fzo1, 115-170 kDa) von Fzo1 detektiert werden. Der *Δubi4* Stamm zeigte im Vergleich zum WT eine starke Akkumulation von unmodifiziertem und modifiziertem Fzo1. Im Gegensatz dazu war nach Rapamycin-Behandlung ubiquitiniertes Fzo1 im *Δubp3* Stamm nur schwierig nachweisbar. Trotz ungleichmäßiger Ladung (Abb. 45 A, Ponceau des Inputs) waren die Proteinmengen innerhalb der unbehandelten Proben (- Rapamycin) bzw. behandelten Proben (+ Rapamycin) vergleichbar.

4 Diskussion

Der selektive Abbau von Mitochondrien ist ein evolutionär konservierter Prozess, der für die Aufrechterhaltung von gesunden Zellen essentiell ist. Die Zunahme von dysfunktionalen Mitochondrien resultiert in einer Schädigung der Zelle durch u.a. übermäßig hohe Synthese von ROS, das zum Zelltod führen kann. Im Menschen ist die Störung der Mitophagie mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen, inklusive der Parkinson-Krankheit, assoziiert. Man unterscheidet zwei prinzipielle Induktionswege: die **Ubiquitin-vermittelte** und die **Rezeptor-vermittelte** Mitophagie. In *Saccharomyces cerevisiae*, einem nützlichen Modellorganismus, wurden zwar viele Kernkomponenten der nicht-selektiven Autophagie und Mitophagie identifiziert, jedoch wurde bislang nur der Rezeptor-vermittelte selektive Abbau von Mitochondrien dokumentiert.

In Kooperation mit Müller et al. konnte durch den Einsatz einer genomweiten Untersuchung von fast 5000 nicht-essentiellen Genen in Bäckerhefe der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex als Inhibitor der Mitophagie identifiziert und Ubiquitin indirekt mit der Regulation der Mitophagie assoziiert werden (Müller et al, 2015). Diese Beobachtung gab die Richtung der vorliegenden Arbeit an und führte zur genaueren Analyse der Rolle der Ubiquitinierung in der Aktivierung des selektiven Abbaus von Mitochondrien.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in *S. cerevisiae* die Ubiquitinierung direkt an der Regulation der Mitophagie beteiligt ist. Mehrere erhaltene Resultate bekräftigen diese Hypothese. Zum einen wurde die katalytische Aktivität der Deubiquitinase Ubp3 als essentiell für deren Einfluss auf die Mitophagie identifiziert und impliziert dadurch, dass die Ubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen für die Induktion dieses Prozesses von Bedeutung ist, das wiederum experimentell demonstriert wurde (Abb. 34). Zum zweiten wurde der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex an den Mitochondrien nach Rapamycin-induzierter Mitophagie detektiert, welches abermals dafür spricht, dass der Komplex am selektiven Abbau von Mitochondrien beteiligt ist. Drittens, wurde das Polyubiquitin Ubi4 an den Mitochondrien lokalisiert und eine direkte Beteiligung an der Aktivierung der Mitophagie unabhängig von der Induktionsmethode aufgezeigt (Abb. 27 und 28). In diesem Zusammenhang wurde die K48-Ubiquitinkettenverknüpfung zur effektiven Aktivierung identifiziert (Abb. 29) und eine Interaktion zwischen Rezeptor- und Ubiquitin-

vermittelter Mitophagie dargestellt (Abb. 20 und 32). Zum Schluss wurde die Ubiquitinierung des mitochondrialen Außenmembranproteins Fzo1 als Vermittler des selektiven mitochondrialen Abbaus demonstriert (Abb. 41 und 42) und dadurch eine weitere Parallele zu Säugerzellen gezogen, in denen das Fzo1 Ortholog Mitofusin (Mfn1/2) eine ähnliche Rolle übernimmt.

Diese Ergebnisse untermauern die Bedeutung der Bäckerhefe als Modellorganismus zur Untersuchung der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie und die evolutionäre Konservierung dieses grundsätzlichen Induktionswegs. In den folgenden Abschnitten soll auf die einzelnen Punkte genauer eingegangen werden.

4.1 Regulation der Mitophagie durch den Ubp3/Bre5 Deubiquitinase-Komplex

Ubp3 ist eine Ubiquitin-spezifische Protease, die mit dem Co-Faktor Bre5 einen aktiven symmetrischen heterotetrameren Komplex bildet (Li et al, 2007; Li et al, 2005). Die Deubiquitinase (DUB) ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, darunter die Modulation der Genexpression infolge der Phosphorylierung durch Hog1 als Reaktion auf osmotischen Stress (Sole et al, 2011). Darüber hinaus interagiert die DUB mit Sir4 und reguliert Gen-Silencing (Moazed & Johnson, 1996). Neuste Untersuchungen zeigten, dass Ubp3 und eine weitere Deubiquitinase, Ubp2, für den proteasomalen Abbau von zytosolisch falsch gefalteten Proteinen nach Hitzeschock verantwortlich sind (Fang et al, 2016). Interessanterweise wurde Ubp3 bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Formen der selektiven Autophagie identifiziert. So induziert Ubp3 den Abbau der großen ribosomalen Untereinheit (60S Ribophagie), jedoch nicht die 40S Ribophagie (Kraft et al, 2008). Des Weiteren ist das Enzym teils für die Autophagie von Proteasomen (Proteaphagie) verantwortlich. Die Stickstoffmangel-induzierte Proteaphagie gliedert sich in zwei separate Abbauewege: Degradation der Kernpartikel- und Regulatorpartikel-Untereinheit. Die Entfernung der Kernpartikel, jedoch nicht der Regulatorpartikel, ist Ubp3-abhängig (Waite et al, 2016).

In Zusammenarbeit mit Matthias Müller wurde eine weitere Form der selektiven Autophagie, die Mitophagie, als Ubp3-abhängiger Weg identifiziert (Abb. 46). Die Deletion von *UBP3* oder *BRE5* führte zur erhöhten Mitophagie-Aktivität und Reduktion der nicht-selektiven Autophagie. Diese Ergebnisse sind erstaunlich, da bislang keine dokumentierten Belege für die

Rolle der Deubiquitinierung bzw. Ubiquitinierung in der Regulation der Mitophagie in Hefe vorlagen.

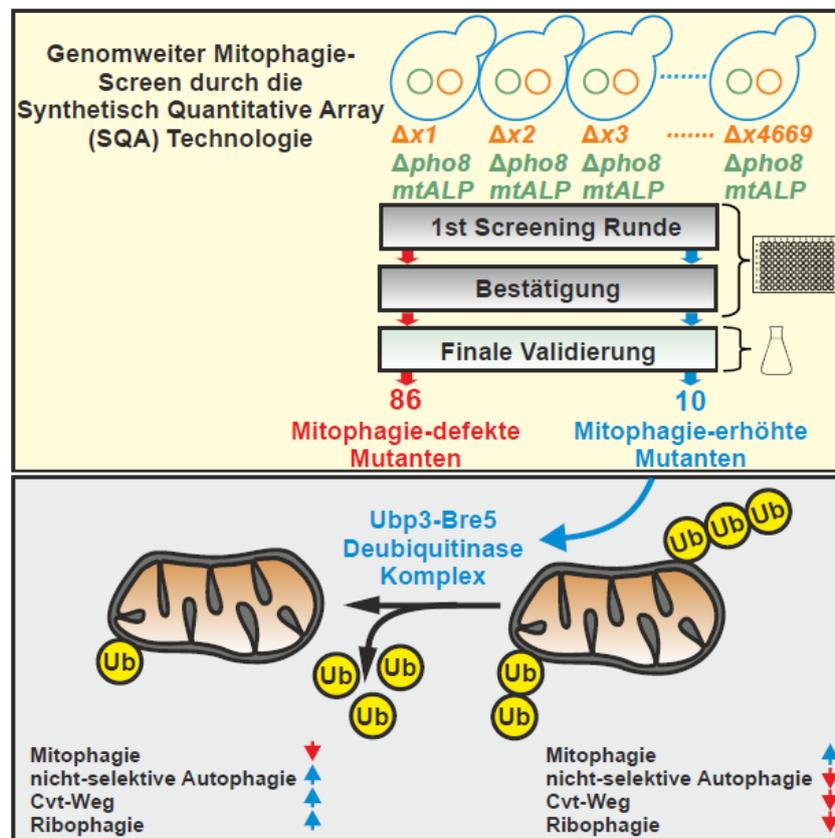


Abbildung 46: Ubp3 und Bre5 beeinflussen die Mitophagie und die nicht-selektive Autophagie durch reziproke Regulation (adaptiert nach (Müller et al, 2015)). Schematische Darstellung der genomweiten Untersuchungen von Mitophagie-Modulatoren und der Einfluss des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes auf verschiedene Formen der selektiven und nicht-selektiven Autophagie. Ub= Ubiquitin

Darüber hinaus wurde die katalytische Aktivität der Deubiquitinase Ubp3 als notwendig für die Regulation der Mitophagie und der nicht-selektiven Autophagie identifiziert (Abb. 15). Dieses Resultat demonstriert, dass die Deubiquitinierung vermittelt durch das Enzym Ubp3 entscheidend für die Inhibierung dieses autophagischen Prozesses ist und nicht durch andere regulatorische Effekte seitens der Ubiquitin-spezifischen Protease entstand.

Durch mikroskopische und biochemische Analyse wurde eine dynamische Translokation der Proteine Bre5 und Ubp3 nach Rapamycin-induzierter Mitophagie vom Zytosol zu den Mitochondrien aufgezeigt (Abb.17). Diese Beobachtung impliziert eine direkte Verbindung des Deubiquitinase-Komplexes mit den Mitochondrien und eine mögliche Rolle in deren Abbau. Die Translokation von Bre5 und Ubp3 wurde teils durch die Deletion des jeweiligen Komplexpartners beeinflusst (Vergleich Abb. 17, 18 und 19). Biochemisch konnte eine

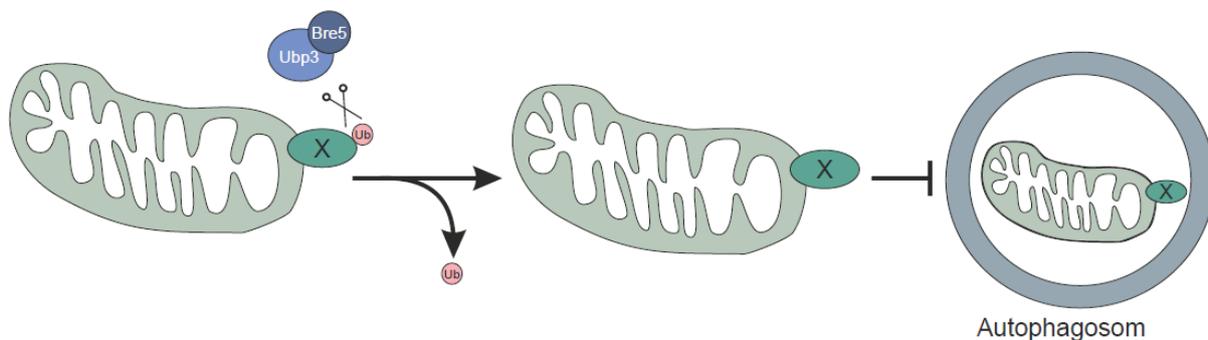
deutliche Akkumulation der beiden Proteine in Abwesenheit des jeweiligen Komplexpartners in der Mitochondrienfraktion lokalisiert werden, die nach Induktion der Mitophagie abnahm. Die Deletion des Komplexpartners führte vermutlich zu einer Instabilität der Proteine an den Mitochondrien, aber hatte generell keinen Effekt auf die mitochondriale Lokalisation. Mikroskopisch konnte dies nur schwierig beobachtet werden. Gründe hierfür könnten eine falsche Beurteilung des grün fluoreszierenden GFP-Signals sein, d.h. es konnte nicht unterschieden werden, ob es sich um freies GFP (durch Prozessierung des Fusionsproteins) oder das Fusionsprotein (Bre5-GFP oder Ubp3-GFP) selbst handelt. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass das chromosomal gekoppelte grün fluoreszierende Protein an Bre5 oder Ubp3 einen Einfluss auf die Komplexbildung, Lokalisation oder deren Funktion hat. Studien zeigten, dass die Proteinmarkierung (durch z.B. GFP) die Lokalisierung maskieren oder die Proteintranslokation durch Membranen hemmen kann (Deponte, 2012; Harner et al, 2011). Zukünftige Untersuchungen müssen diesen offenen Fragen nachgehen. Die zelluläre Lokalisierung könnte unter anderem durch den Einsatz des endogenen Antikörpers von Bre5 und Ubp3 verifizieren werden und somit mögliche Einflüsse seitens des GFP-Proteins ausschließen. Die Expression von HA-Bre5 und HA-Ubp3 mit anschließender Detektion des HA-Signals, wäre eine weitere Möglichkeit zur Klärung der genauen Lokalisation.

Aus den oben genannten Beobachtungen ergeben sich zwei mögliche Ansatzpunkte zur Regulation der Mitophagie vermittelt durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex. Erstens, die Deubiquitinierung von Zielprotein(en), die Substrate einer unbekanntem Ligase sind, oder zweitens die direkte Hemmung der unbekanntem Ligase durch Deubiquitinierung (Abb.47).

Die erste Möglichkeit, die Deubiquitinierung von mitochondrialen Außenmembranproteinen würde voraussetzen, dass in einer vorherigen Reaktion eine Ligase das/die Zielprotein/e der äußeren Mitochondrienmembran ubiquitiniert und dadurch die Mitophagie induziert. Für diese Hypothese spricht die Hyperubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen im $\Delta ubp3$ Stamm verglichen mit dem Wildtyp. In Abwesenheit der Deubiquitinase konnte Ubiquitin von den Substraten nicht entfernt werden. Die Tatsache, dass Ubp3 und sein Co-Faktor Bre5 dynamisch vom Zytosol zu den Mitochondrien nach Rapamycin-induzierter Mitophagie translozieren, spricht ebenfalls für diese Hypothese (Müller et al, 2015). Übereinstimmend mit dieser Annahme ist der Befund, dass in Säugern die Enzyme USP15, USP30 und USP35 durch Entfernen von Ubiquitin-Molekülen von Zielproteinen der Ligase Parkin Mitophagie regulieren

(Bingol et al, 2014; Cornelissen et al, 2014; Cunningham et al, 2015; Wang et al, 2015). Die dazugehörige Ligase konnte im Zuge dieser Arbeit in *S. cerevisiae* nicht ermittelt werden. Jedoch identifizierte die genomweite Untersuchung der nicht-essentiellen Gene in Bäckerhefe diverse E2- und E3 Enzyme, deren Deletion eine zum Teil starke Hemmung der Mitophagie zeigten. Darunter waren $\Delta ubc8$, $\Delta not5$ oder $\Delta mot2$. Diese Daten müssen noch verifiziert werden, um einen direkten Einfluss der E2-Enzyme bzw. Ligasen auf den selektiven Abbau von Mitochondrien zu bestätigen, aber heben die evolutionär konservierte Rolle der Ubiquitinierung in der Mitophagie hervor.

1.) Hemmung durch Deubiquitinierung von Substrat X



2.) Hemmung durch Deubiquitinierung von Ligase

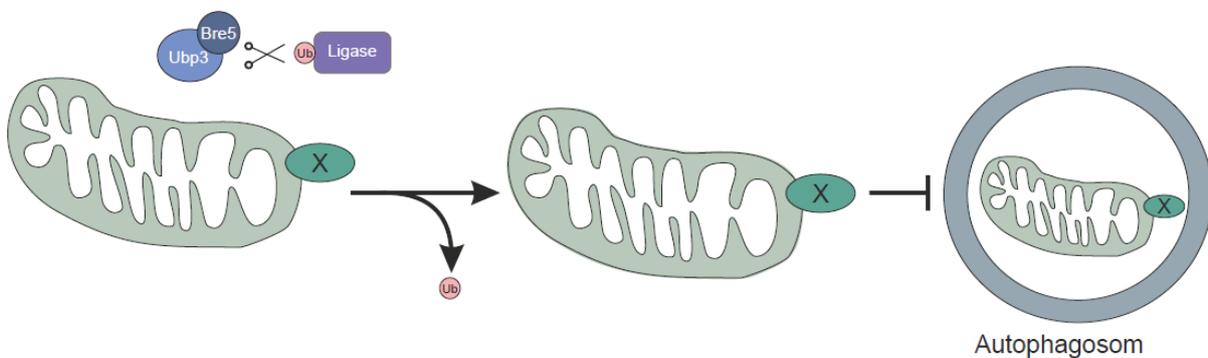


Abbildung 47: Regulation der Mitophagie durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex. Dargestellt sind zwei prinzipielle Reaktionswege, wie die Ubiquitin-spezifische Protease den selektiven Abbau von Mitochondrien inhibiert: 1.) Durch Abtrennen von Ubiquitin des Substrats (X) liegt dieses deubiquitiniert vor und kann die Mitophagie nicht induzieren. Als Substrat X könnten nur ein oder mehrere mitochondriale Außenmembranproteine in Frage kommen. 2.) Durch Deubiquitinierung der ubiquitinierten Ligase wird die Aktivität der Mitophagie inhibiert. Ub = Ubiquitin

Der zweite mögliche Ansatzpunkt der Ubiquitin-spezifischen Protease Ubp3 zur Hemmung der Mitophagie wäre ein direkter Einfluss auf die Mitophagie-induzierende Ligase. Der Vergleich mit Säugerzellen zeigt, dass dieser regulatorische Ansatzpunkt prinzipiell denkbar wäre. Die

Deubiquitinase USP8 entfernt Lysin6-verknüpfte Polyubiquitinketten von der E3 Ligase Parkin und verstärkt dadurch den autophagischen Abbau von Mitochondrien (Durcan et al, 2014). Allgemein ist die eigene Ubiquitinierung eine stark verbreitete Eigenschaft von vielen Ligasen und wurde als Signal zum Abbau der Ligase vorgeschlagen (Huibregtse et al, 1995; Lorick et al, 1999). Die Daten demonstrieren jedoch, dass in *Δubi4* die K48-Ubiquitinverknüpfung, die in der Regel den proteasomalen Abbau induziert, für eine effektive Induktion der Mitophagie benötigt wird. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass diese Kettenverknüpfung in Abwesenheit von Ubp3 vermehrt vorliegt und impliziert, dass das Enzym diese Verbindung schneiden kann. Aus diesen Tatsachen lässt sich vermuten, dass die eigene K48-verknüpfte Ubiquitinierung der Ligase die Mitophagie fördert und im Gegenzug die Deubiquitinierung vermittelt durch Ubp3 die selektive Eliminierung von Mitochondrien inhibiert.

Für das humane Homolog von Ubp3, USP10, wurde beobachtet, dass eine Hemmung der Aktivität von USP10 in einer Inhibierung der nicht-selektiven Autophagie resultiert (Liu et al, 2011) und steht damit im Einklang mit den erhaltenen Resultaten für Ubp3 in der Bäckerhefe. Ebenfalls ist für Bre5 ein Homolog, G3BP1, bekannt. Zusammen mit USP10 bildet G3BP1 einen Deubiquitinase-Komplex und nimmt damit die gleiche Rolle ein, wie Bre5 in *S.cerevisiae* (Martin et al, 2016). Takahashi *et al.* (2013), demonstrieren kürzlich das USP10 für die Regulation von Stressgranula (dynamische Strukturen bestehend aus Proteinen und RNAs, die als Antwort auf Zellstress entstehen) verantwortlich ist und somit eine weitere Funktion mit dem Bäckerhefekomolog Ubp3 teilt (Nostramo & Herman, 2016; Nostramo et al, 2016; Takahashi et al, 2013). Die funktionellen Übereinstimmungen zwischen Ubp3 und USP10 lassen die Vermutung zu, dass auch die Regulation der Mitophagie in Säugern vermittelt durch die Deubiquitinase USP10 erfolgt. Dies muss jedoch erst demonstriert werden. Eine positive Detektion des Enzyms USP10 als Regulator der selektiven Eliminierung von Mitochondrien würde *S.cerevisiae* als Modellorganismus zur Untersuchung der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie bekräftigen.

Trotz dieser möglichen Regulation der Mitophagie durch die Deubiquitinierung mittels des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes stellt dieser zelluläre Mechanismus keinen Rezeptor-unabhängigen Weg dar. Durch die zusätzliche Deletion von *ATG32* wurde demonstriert, dass die Beeinflussung der Mitophagie durch die Ubiquitin-spezifische Protease vom

mitochondrialen Außenmembranprotein Atg32 abhängig ist (Abb. 20). Diese Verknüpfung zwischen der Rezeptor-vermittelten und Ubiquitin-vermittelten Mitophagie wurde bereits in Säugern beobachtet. Eine kürzlich veröffentlichte Studie identifizierte den Rezeptor NIX1 als wesentlich für die Rekrutierung der E3 Ligase Parkin zu den Mitochondrien nach Induktion der Mitophagie (Ding et al, 2010). In *S.cerevisiae* könnte Atg32 an der Translokation des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes zu den Mitochondrien involviert sein. Eine mitochondriale Lokalisation der Proteine Ubp3 und Bre5 konnte bereits detektiert werden. Eine Atg32-Abhängigkeit dieser zellulären Lokalisierung steht noch aus. Interessanterweise konnte in der Abwesenheit von *UBP3* ein veränderter Phosphorylierungsstatus von Atg32 detektiert werden (Abb. 33). Unter normalen Wachstumsbedingungen lag ein erhöhter Anteil an phosphoryliertem Atg32 in $\Delta ubp3$ vor. Nachweislich trägt die Phosphorylierung von Atg32 am Serin 114 zur Induktion der Mitophagie bei (Aoki et al, 2011; Kanki et al, 2013), so dass diese verstärkte Modifikation des mitochondrialen Rezeptors durch Deletion von *UBP3* zur Mitophagie-Erhöhung in diesem Stamm beitragen könnte. Diese Theorie muss noch überprüft werden, u.a. durch Messung der Aktivität an Mitophagie nach Blockieren der Phosphorylierungsstelle von Atg32 (oder der Kinase CK2) in $\Delta ubp3$.

4.2 Gen-spezifischer Effekt auf verschiedene Formen der Autophagie in

Abhängigkeit vom Ubiquitin-kodierenden Gen

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Einfluss der drei nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Gene *UBI1*, *UBI2* und *UBI4* auf verschiedene selektive Wege der Autophagie analysiert. Die Resultate demonstrierten, dass diese drei Gene sehr spezifische und teilweise antagonistische Effekte auf unterschiedliche selektive Wege der Autophagie haben. Alle drei Gene synthetisieren ein Ubiquitin-Fusionsprotein, das nach der Reifung unabhängig vom kodierenden Gen ein Ubiquitin-Molekül mit der identischen Aminosäuresequenz entlässt. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass nur das Polyubiquitin Ubi4 für die Mitophagie erforderlich ist. Im Vergleich dazu beeinflussten alle drei Gene die ER-phagie und beweisen dadurch, dass *UBI1* bzw. *UBI2* generell in der Lage sind, Ubiquitin für einen selektiven Autophagie-Weg bereitzustellen. Die Ubiquitin-vermittelte Induktion des selektiven Abbaus des ERs ist bislang nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die 40S und 60S Ribophagie waren ebenfalls Gen-spezifisch beeinflusst. Das Fehlen des Polyubiquitin-kodierenden Gens *UBI4* führte zur Inhibierung des Abbaus der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit. Die Deletion von *UBI1* oder *UBI2* bewirkt eine verstärkte Aktivität der 40S Ribophagie, während die 60S Ribophagie um 40% durch die Abwesenheit von Ubi1 reduziert wurde. Diese Daten sind im Einklang mit bisherigen Studien, in denen der Einfluss der E3 Ligase Ltn1 und des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex in der 60S Ribophagie demonstriert wurde (Kraft et al, 2008; Ossareh-Nazari et al, 2014).

Der Cvt-Weg und die nicht-selektive Autophagie waren durch Rapamycin-Induktion nicht betroffen. Diese Resultate demonstrieren, dass Ubiquitin nicht durchweg für die unterschiedlichen Formen der selektiven Autophagie verantwortlich ist, sondern die Ubiquitin-kodierenden Gene spezifisch bestimmte autophagische Wege regulieren. Die möglichen Gründe für diese Gen-spezifische Beeinflussung werden nachstehend im Detail aufgeführt.

4.2.1 UBI1 und UBI2 beeinflussen spezifisch die 60S Ribophagie

Die unterschiedliche Wirkung auf den Abbau der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit vermittelt durch *UBI1* oder *UBI2* könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass beide Gene ein identisches Fusionsprotein kodieren, das sich aus Ubiquitin gebunden an die große ribosomale Untereinheit L40 zusammensetzt. Beide Gene wurden mit der zytoplasmatischen Reifung der 60S-Ribosomen assoziiert (Fernandez-Pevada et al., 2012), sodass eine Deletion dieser Gene die Assemblierung der 60S-Untereinheit beeinträchtigt und schlussendlich die Translation einschränkt. Unter diesen physiologischen Bedingungen ist es zu erwarten, dass der Abbau der großen ribosomalen Untereinheit unterdrückt wird und die 40S Ribophagie gefördert wird, um die Balance zwischen dem Kontingent an großer und kleiner Untereinheit zu halten. Die Daten weisen ferner darauf hin, dass 40S Ribophagie abhängig von *UBI4* ist.

Der Gen-abhängige Einfluss von *UBI1* und *UBI2* auf verschiedene selektive Formen der Autophagie könnte auf Unterschiede in ihren Expressionsniveaus oder in der Intronsequenz zurückzuführen sein. *UBI2* kodiert zum *UBI1* ein äquivalentes Fusionsprotein, das identisch in der Sequenz ist, trotz eines 15%igem Unterschieds im Nukleotidsequenzlevel zwischen ihrer Kodierungsregion. Die beiden Introns unterscheiden sich in ihrer Größe und zeigen keine

Sequenzähnlichkeit (Ozkaynak et al, 1987) und es wurde vorgeschlagen, dass einige Hefe-Introns regulatorische Funktionen inne haben, da sie selten sind und nicht zufällig zwischen Genen verschiedener funktioneller Klassen verteilt sind (Dabeva et al, 1986). Dennoch wurden bisher keine regulatorischen Funktionen für die Introns in den Genen *UBI1* und *UBI2* beschrieben. Des Weiteren unterscheidet sich die flankierende Region von *UBI1* und *UBI2*, so dass es möglich ist, dass die identisch kodierten Proteine *in vivo* unterschiedlich reguliert werden (Ozkaynak et al, 1987).

Da das Hauptaugenmerk dieser Dissertation auf der Mitophagie lag, wurde der Einfluss von *UBI1* und *UBI2* auf andere Formen der selektiven Autophagie nicht detailliert analysiert. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Effekt auf die unterschiedlichen selektiven Formen der Autophagie nicht direkt auf das entsprechende Gen zurückgeführt werden kann. Die jeweilige Gendeletion wurde per PCR-Analyse verifiziert, kann jedoch eine unbekannte zusätzliche Mutation nicht ausschließen. Der verwendete Stammhintergrund (BY4742, Wildtyp) ist ein häufig verwendeter Stamm, der jedoch eine leicht erhöhte Anzahl an Punktmutationen in der mtDNA aufweist (Young & Court, 2008). Eine genaue Analyse und Verifikation dieser Resultate durch Komplementierung steht noch aus.

4.2.2 Die Rolle von *UBI4* für die Induktion der Mitophagie

Die spezifische Beeinflussung des selektiven Abbaus von Mitochondrien durch Ubi4 könnten mehrere Faktoren zu Grunde liegen, die im Einzelnen erörtert werden sollen. Nachweislich wird lediglich die Expression von Ubi4 unter Stressbedingungen wie Hunger, Hitzeschock oder auch chemischer Belastung induziert (Finley et al, 1987; Ozkaynak et al, 1987). Ubi1-Ubi3 werden unter normalen Wachstumsbedingungen synthetisiert. Diese dokumentierten Erkenntnisse stimmen mit den hier vorliegenden Ergebnissen überein, da nur *UBI4* das einzige nicht-essentielle Ubiquitin-kodierende Gen ist, das sowohl die Mitophagie, ER-phagie und die Ribophagie (40S und 60S Degradation) vermittelt. Zellulär könnten diese entsprechenden Organellen (Mitochondrien, ER und Ribosome) unter extremen Bedingungen Priorität für das Überleben der Zelle besitzen und dadurch einen Ubi4-abhängigen Reaktionsweg einleiten.

Strukturell unterscheidet sich Ubi4 deutlich von den anderen drei Ubiquitin-kodierenden Genen. Das Protein wird als einziges als ein Polyubiquitin Vorläufer kodiert. Dieser Vorläufer wurde nachweislich an den Mitochondrien detektiert (Abb.37). Möglicherweise ist es energetisch effizienter mitochondriale Außenmembranproteine nach Mitophagie-Induktion zu polyubiquitinieren, wenn das Polyubiquitin direkt übertragen wird und nicht mehrere einzelne Ubiquitin-Moleküle. Dies würde auch erklären warum nur *UBI4* einen Effekt auf die Mitophagie zeigt. Eine Publikation in Säugetierzellen demonstriert, dass die Phosphorylierung von Polyubiquitin die Aktivierung und die mitochondriale Translokation der E3 Ligase PARKIN fördert und untermauert damit die Bedeutung von Polyubiquitin in der Induktion der selektiven Eliminierung von Mitochondrien (Shiba-Fukushima et al, 2014). Die biochemische Analyse der zellulären Lokalisation des Ubi4 Vorläufers identifizierte, neben der mitochondrialen Translokation, mögliche Modifikationen des Proteins (Abb.37). Diese könnten posttranslationale Phosphorylierungen des Ubi4-Moleküls sein und würden damit dem Modell in Säugerzellen entsprechen. Eine massenspektrometrische Analyse muss die Hypothese zuerst verifiziert. Darüber hinaus müssen zukünftige Studien in diesem Bereich zeigen, ob die unbekannte Mitophagie-induzierende Ligase durch Polyubiquitin aktiviert bzw. ihre mitochondriale Translokation begünstigt wird und damit mit dem Modell in Säugern gleichzusetzen ist.

4.2.2.1 K48-verknüpfte Ubiquitinketten induzieren Mitophagie

Monoubiquitinierte Zielproteine können mittels der Verknüpfung zusätzlicher Ubiquitinreste mit einem der sieben Lysinreste (K6, K11; K27, K29, K33, K48 und K63) oder mit dem N-Terminus einer bereits verknüpften Ubiquitineinheit polyubiquitiniert werden. In Säugern wurden für die PINK1/PARKIN-vermittelte Mitophagie mehrere Ubiquitinverknüpfungen vorgeschlagen. Dokumentiert wurde unter anderem, dass K6 (Durcan et al, 2014), K48 (Chan et al, 2011) und K63 (Chan et al, 2011; Cornelissen et al, 2014; Narendra et al, 2010)-verknüpfte Ubiquitinketten, den selektiven Abbau von Mitochondrien induzieren. Diese Arbeit demonstriert, dass in Bäckerhefe die K48-Bindung kritisch für die Induktion der Mitophagie ist, da in $\Delta ubi4$ Zellen die Aktivität der Mitophagie durch die Mutation des Lysin der Position 63 äquivalent zum Wildtyp-Ubiquitin war. Die Veränderung des Lysins 48 allein oder in Kombination mit einer weiteren Lysinmutante zeigte eine stark beeinträchtigte Mitophagie-Aktivität.

Die jüngste proteomische Studie dokumentierte, dass in Abwesenheit der Deubiquitinase Ubp3 eine Zunahme an K48-gebundenen Ubiquitinketten vorlag (Isasa et al, 2015). Durch diesen Befund und die vorliegenden Ergebnisse, dass mitochondriale Proteine in $\Delta ubp3$ Zellen hyperubiquitiniert sind, ergibt sich, dass der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex Polyubiquitin von mitochondrialen Außenmembranproteinen entfernt oder sogar das Polyubiquitin Ubi4 schneidet und dadurch die Mitophagie inhibiert. Die Tatsache, dass der Einfluss auf den selektiven Abbau von Mitochondrien vermittelt durch Ubp3 abhängig von Ubi4 ist, untermauert diese Theorie.

4.2.2.2 Ubi4-abhängige Mitophagie-Induktion ist Atg32-abhängig

Der Einfluss auf die selektive Eliminierung von Mitochondrien durch Ubi4 war vom mitochondrialen Rezeptor Atg32 abhängig und ist ein weiteres Beispiel für die Interaktion der Ubiquitin-vermittelten und die Rezeptor-vermittelten Mitophagie in Bäckerhefe. Kürzlich demonstrierte eine Studie, dass PINK1-phosphoryliertes Ubiquitin unabhängig von PARKIN die autophagischen Rezeptoren Optineurin und NDP52 zu den Mitochondrien rekrutiert, um den selektiven Abbau dieser Organellen einzuleiten (Lazarou et al, 2015). In *S.cerevisiae* könnte phosphoryliertes Ubi4 den mitochondrialen Rezeptor Atg32 zu den Mitochondrien rekrutieren. Diese Hypothese muss noch bewiesen werden.

Die Deletion von *UBI4* beeinträchtigte nicht negativ die Atg32 Expression und beweist dadurch, dass der Rückgang an Mitophagie-Aktivität in $\Delta ubi4$ Zellen nicht auf eine reduzierte Atg32 Proteinmenge zurückzuführen ist (Abb.33). Interessanterweise konnte sogar unter normalen Wachstumsbedingungen ein höherer Anteil an Atg32 in dieser Mutante detektiert werden. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da man vermuten würde, dass ein Anstieg der Atg32 Proteinmenge gleichzeitig eine Zunahme an Mitophagie bewirken würde. Das Gegenteil ist jedoch bei Eliminierung von *UBI4* der Fall. Möglicherweise verursacht die Abwesenheit des Polyubiquitin-kodierenden Gens unter normalen Wachstumsbedingungen einen zellulären Stress, der dazu führt, dass der Rezeptor Atg32 vermehrt induziert wird um die Mitophagie einzuleiten. Da jedoch Ubi4 selbst für die Induktion der Mitophagie benötigt wird, steigt lediglich die Proteinmenge an Atg32. Denkbar wäre auch, dass durch das Fehlen von *UBI4* eine Akkumulation an dysfunktionalen Mitochondrien stattfindet, die durch die

beeinträchtigte Mitophagie-Maschinerie nicht abgebaut werden können und dadurch vermehrt Atg32 detektiert wird.

4.3 Fzo1 ist ein Substrat für den Ubiquitin-vermittelten Weg der Mitophagie

Ein wichtiger Befund dieser Arbeit ist die Identifizierung des mitochondrialen Außenmembranproteins Fzo1 als Substrat für den Ubiquitin-vermittelten Weg der Mitophagie. Dieser Befund untermauert entscheidend die Ansicht, dass der Ubiquitin-vermittelte Induktionsweg des selektiven Abbaus von Mitochondrien evolutionär konserviert ist. In *S.cerevisiae* spielt dieses Protein eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Fusion und Fission (Anton et al, 2013; Anton et al, 2011; Cervený et al, 2007). Neben diesen Funktionen wurde nun das Fzo1 als erforderlich für die Induktion der Mitophagie identifiziert (Abb. 38-40) und ist damit verantwortlich für einen weiteren Aspekt der Qualitätskontrolle von Mitochondrien. In diesem Zusammenhang wurde demonstriert, dass die Ubiquitinierung von Fzo1 am Lysin 464 für eine effektive Aktivierung der Mitophagie notwendig ist (Abb. 42). Die Beeinflussung des selektiven Abbaus von Mitochondrien erfolgte nicht durch einen Defekt der Fusion, schien aber von der *cis*-Dimerisierung von Fzo1 abhängig zu sein (Abb. 44). Wie lassen sich diese Befunde mit den anderen Daten, dass Ubp3 und Ubi4 eine Funktion in der Regulation der Mitophagie innehalten, in Einklang bringen?

Das mitochondriale Außenmembranprotein Fzo1 verfügt strukturell über mehrere Ubiquitinierungsstellen, unter anderem am Lysin der Position 398 und 464, die von verschiedenen Deubiquitinasen erkannt werden. Kürzlich dokumentierte eine Studie, dass Ubp2 und Ubp12 verschiedene Ubiquitinierungsstellen von Fzo1 erkennen und entgegengesetzte Effekte auf die mitochondriale Fusion durch Entfernen von Ubiquitin ausüben (Anton et al, 2013). Ubp12 entfernt K398-verknüpftes Ubiquitin von Fzo1, das für die Induktion der mitochondrialen Fusions nötig ist, und nach der GFP Hydrolyse (Abb. 43) erfolgt. Die Ubiquitin-spezifische Protease Ubp2 dagegen schneidet K48-verknüpfte Ubiquitinketten und verhindert dadurch den proteasomalen Abbau von Fzo1 (Anton et al, 2013). Diese

Ergebnisse demonstrieren, dass die unterschiedliche Modifikation des Mitofusins verschiedene Effekte nach sich ziehen. Für die Aktivierung des selektiven Abbaus von Mitochondrien ist es daher denkbar, dass Fzo1 am Lysin der Position 464 ubiquitiniert wird und dadurch den autophagischen Prozess einleitet (Abb. 48).

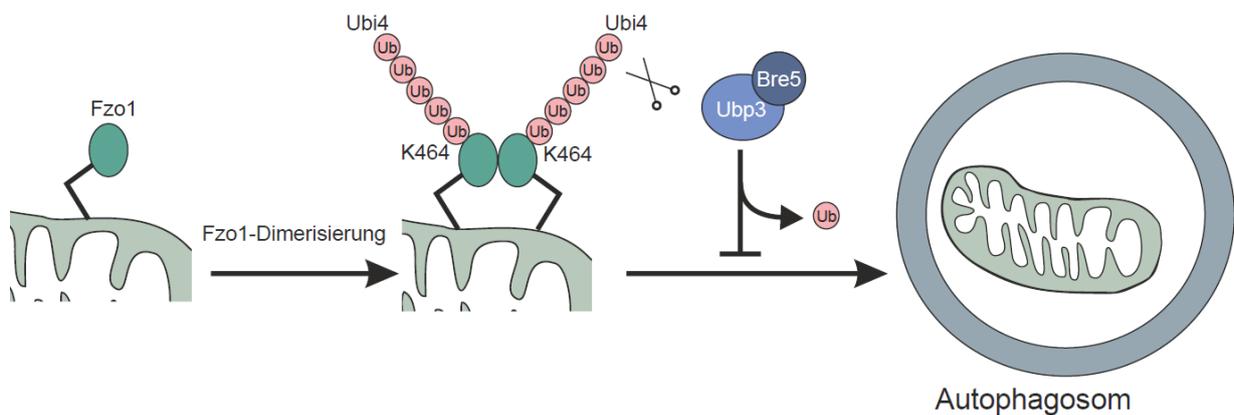


Abbildung 48: Modell zur Rolle der Fzo1-Ubiquitinierung für die Mitophagie. Das Fzo1 Monomer dimerisiert auf der mitochondrialen Außenmembran (*cis*-Assoziation) und fördert durch eine eventuelle Konformationsänderung die Ubiquitinierung des Lysins an der Position 464. Dies ist möglicherweise durch Ubi4 vermittelt. Der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex entfernt Ubiquitin-Molekül(e) an dieser Stelle und inhibiert dadurch die Autophagosom-Bildung. Ub = Ubiquitin.

Die Entfernung von Ubiquitin an dieser Stelle durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex führt zur Inhibierung der Mitophagie. Unklar ist, ob spezifisch ein oder mehrere Ubiquitin-Moleküle durch das Enzym entfernt werden. Die *cis*-Dimerisierung von Fzo1 könnte eine Konformationsänderung bewirken und die Polyubiquitinierung vermittelt durch Ubi4 an dieser Position begünstigen.

Übereinstimmend mit den Daten ist der Befund einer kürzlich veröffentlichten Studie, die demonstriert, dass durch die Deletion des Fusionsfaktors Mgm1 und des Fissionsfaktors Dnm1 die Mitophagie in *Saccharomyces cerevisiae* beeinträchtigt wird (Bernhardt et al, 2015). Bemerkenswerterweise ist der Defekt der selektiven Eliminierung von Mitochondrien in Abwesenheit von *FZO1* deutlicher ausgeprägt als der Effekt, der beobachtet wird, wenn *MGM1* anstelle von *FZO1* entfernt wird, was auf eine direktere Rolle von Fzo1 in der Mitophagie im Vergleich zu Mgm1 hinweist. Die Ubiquitinierung von Fzo1 am Lysin-Rest der Position 398 führt zur mitochondrialen Fusion (Anton et al, 2013), aber nicht zur Induktion der Mitophagie (Abb. 40). Die Blockierung der *trans*-Assoziation von Fzo1-Dimeren hat ebenso

wenig einen Einfluss auf den selektiven Abbau von Mitochondrien (Abb. 44). Diese Resultate stehen im Einklang mit der Auffassung, dass die mitochondriale Fusion selbst keine strikte Voraussetzung für Mitophagie ist und weisen darauf hin, dass ubiquitiniertes Fzo1 als Substrat fungiert, das die Mitophagie vermittelt. Die Relevanz dieser Ergebnisse spiegelt sich in der Tatsache wider, dass das Modell der Fzo1-ubiquitinierten Mitophagie-Induktion mit den Beobachtungen in Säugern übereinstimmt. Studien demonstrierten, dass in Säugerzellen das Mitofusin 1 und Mitofusin 2 ubiquitiniert werden und die Mitophagie aktivieren (Gegg et al, 2010).

Überraschenderweise bewirkte die Deletion von *UBI4* eine Stabilisierung und ein Fehlen von *UBP3* eine Destabilisierung der ubiquitinierten Fzo1-Varianten (Abb. 45). Dieses Ergebnis war unerwartet, da durch mehrere Experimente der spezifische Einfluss des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes und des Polyubiquitins Ubi4 auf die Mitophagie demonstriert wurde. Ursache hierfür könnte sein, dass durch die biochemische Analyse mittels Western Blot Verfahren nur das Molekulargewicht der Fzo1 Spezies detektiert wurden, aber die Art der Ubiquitinkettenverknüpfung und die Ubiquitinierungsstelle des Mitofusins dadurch nicht unterschieden werden können. Ausgehend vom Modell der Mitophagie-Aktivierung durch Fzo1 (Abb. 48) wäre folgende Erklärung der Daten möglich (Abb.49). Im Wildtyp wird durch eine K48-verknüpfte Ubiquitinkette am Fzo1 am Lysinrest 464 vermittelt durch Ubi4 die Mitophagie bzw. der proteasomalen Abbau induziert (Abb.49). Dieser Prozess wird im Wildtyp durch die DUB Ubp3 reguliert. In Abwesenheit von *UBI4* kann das Mitofusin durch Ubiquitin, kodiert von *UBI1-UBI3*, modifiziert werden. Die Ubiquitin-Moleküle bilden eine K63-verknüpfte Kette und aktivieren weder den selektiven Abbau von Mitochondrien noch den proteasomalen Abbau. Dies bewirkt eine generelle Stabilisierung aller Fzo1 Spezies in dieser Mutante (Abb. 45). Die Deletion der Deubiquitinase *UBP3* führt dazu, dass keine K48-verknüpfte Ubiquitinkette an Fzo1 geschnitten wird und fördert dadurch die Induktion der Mitophagie und des proteasomalen Abbaus des Proteins. Dadurch wird das mitochondriale Außenmembranprotein vermehrt abgebaut, so dass die verstärkte Ubiquitinierung durch die Degradation von Fzo1 kompensiert wird.

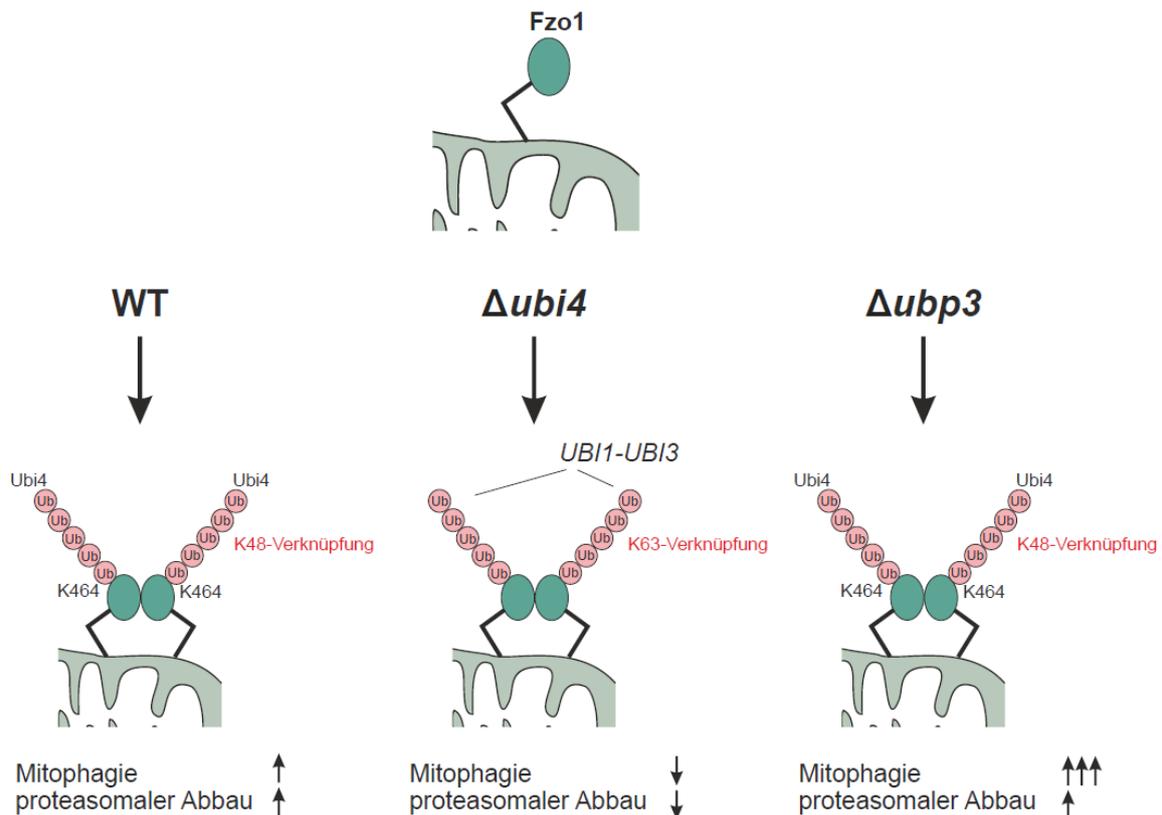


Abbildung 49: Fzo1-Ubiquitinierungsstatus nach Rapamycin-induzierter Mitophagie in Abhängigkeit von Ubi4 und Ubp3. Dargestellt ist die mögliche Modifikation des Proteins Fzo1 nach Rapamycin-Behandlung. Die Ubiquitinierung von Fzo1 im Wildtyp (WT) erfolgt am Lysinrest 464 mit einer K48-verknüpften Ubiquitinkette. Diese induziert die Mitophagie und kann zusätzlich den proteasomalen Abbau einleiten. Im $\Delta ubi4$ Stamm wird das Mitofusin am Lysinrest 398 ubiquitiniert durch eine K63-Verknüpfung und induziert weder Mitophagie noch den proteasomalen Abbau. Im $\Delta ubp3$ Stamm findet eine WT-ähnliche Ubiquitinierung von Fzo1 statt, aber die Abwesenheit der DUB fördert vermehrt die Mitophagie und den proteasomalen Abbau des Proteins.

Für diese Hypothese spricht, dass kürzlich durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe Escobar (Experiment durchgeführt von Selver Altin, Labor Escobar, Universität Köln) demonstriert werden konnte, dass der Fzo1-Abbau nach Rapamycin-Behandlung vom Proteasom abhängt (Abb. 50).

In dieser Arbeit konnten mehrere Befunde dargelegt werden, dass die Mitophagie von der Ubiquitinierung von Fzo1 abhängt, sowie durch den Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex und Ubi4 reguliert wird. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass *S.cerevisiae* ein sehr nützliches Modelorganismus für die Analyse der Regulation der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie ist. Weitere Studien müssen dem Einfluss von Ubi4 und Ubp3 in der Fzo1-Ubiquitinierung nach Mitophagie-Induktion nachgehen. Speziell muss der Frage nachgegangen werden, ob die Ubiquitinierung von Fzo1 am Lysinrest 464 von *UBI4* und *UBP3* abhängt. Die Antwort auf diese

Frage würde entscheidend zum Verständnis der Interaktion zwischen Fzo1, Ubi4 und Ubp3 beitragen. Ebenso muss die Rolle des Proteasoms im Abbau von Fzo1 nach Rapamycin-Behandlung in Abhängigkeit von *UBI4* und *UBP3* und die mögliche Verbindung zur Mitophagie analysiert werden.

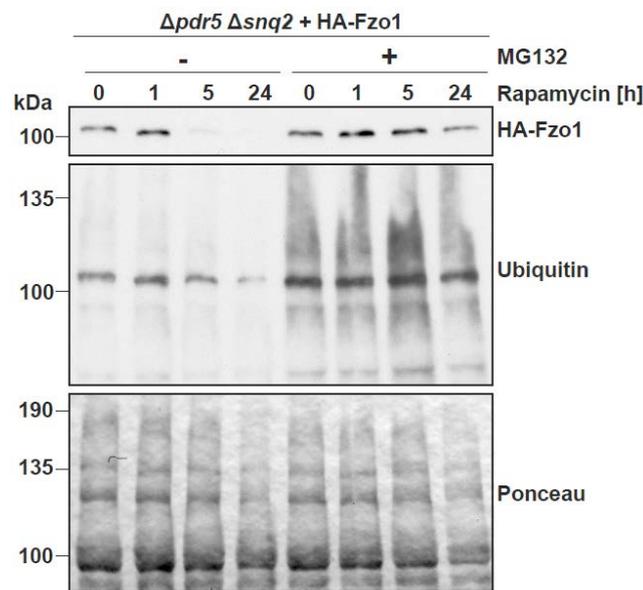


Abbildung 50: Mitophagie induzierter Fzo1-Abbau in Abhängigkeit vom Proteasom (Experiment durchgeführt von Selver Altin, Labor Escobar, Universität Köln). Analyse der Fzo1-Proteinmenge im $\Delta pdr5 \Delta snq$ Stamm in Gegenwart oder Abwesenheit einer proteasomalen Inhibition durch MG132 nach 0, 1, 5 oder 24 h Rapamycin-Behandlung. Die Deletion von *PDR5* und *SNQ2* verhindert die Resistenz gegenüber MG132. Dieser Stamm wurde verwendet, um die Proteasom-abhängige Hemmung des Fzo1-Abbaus durch Rapamycin-Behandlung zu testen. Der $\Delta pdr5 \Delta snq$ Stamm exprimiert HA-Fzo1 und wurde in SG-Medium für mindestens drei Tage kultiviert. MG132 (100 μ M) oder DMSO wurden für 1 Stunde zugegeben (Vorbehandlung), gefolgt von der Zugabe von 1 μ M Rapamycin für die angegebenen Zeiten. Die Fzo1-Proteinmenge wurde durch Western Blot Analyse der Zellextrakte unter Verwendung eines anti-HA Antikörpers bestimmt. Ein repräsentativer Immunoblot ist dargestellt und Ponceau diente als Ladesteuerung.

5 Zusammenfassung

Mitochondrien sind doppelmembranöse, essentielle Organelle, dessen Aufgabe unter anderem die zelluläre Energiebereitstellung in Form von ATP ist. Als Nebenprodukt der ATP-Synthese entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die neben der Funktion als Signalstoffe auch zu erheblichen Schäden in der Zelle, u.a. Schädigung der mtDNA, Lipide und Proteine, führen können. Dysfunktionale Mitochondrien sind mit zahlreichen humanen Erkrankungen assoziiert. Die autosomal dominante Optikusatrophie Typ 1, Krebs, Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A und 4A, Diabetes und Morbus Parkinson sind nur einige Beispiele (Amati-Bonneau et al, 2008; Patti & Corvera, 2010; Schroder, 2006). Zur Beschränkung bzw. Vermeidung mitochondrialer Schäden hat die Zelle zahlreiche Qualitätskontrollmechanismen entwickelt (Ni et al, 2015). Beispielsweise erkennen molekulare Chaperone falsch gefaltete Proteine und sind Bestandteile der Proteinqualitätskontrolle. Ganze Mitochondrien können über einen selektiven Prozess der Autophagie, genannt Mitophagie, abgebaut werden. Die Autophagie stellt einen zellulären Prozess dar, bei dem cytoplasmatische Komponenten in die Vakuole bzw. Lysosom (bei Säugern) transportiert und durch Hydrolasen abgebaut werden. Hypoxie, Infektionen oder Nährstoffmangel führen zur vermehrten Aktivierung der Autophagie. Generell wird zwischen selektiver und nicht-selektiver Autophagie unterschieden, wobei das erstere sich durch die spezifische Sequestrierung von bestimmten Proteinen oder Organellen auszeichnet. In den letzten Jahren wurden zahlreiche selektive Arten der Autophagie, sowie mehr als 40 Atg-Gene (engl. ‚*autophagy-related*‘), deren Produkte an der selektiven und nicht-selektiven Autophagie beteiligt sind, identifiziert. Einige sind nur für spezifische autophagische Prozesse verantwortlich. Beispielsweise wurde das mitochondriale Außenmembranprotein Atg32 als spezifischer Rezeptor für die Induktion der Mitophagie in Hefe entdeckt (Kanki et al, 2009b; Okamoto et al, 2009). Generell unterscheidet man zwei prinzipielle Reaktionswege zum selektiven Abbau von Mitochondrien: die Ubiquitin-vermittelte und die Rezeptor-vermittelte Mitophagie (Tan et al, 2016). In Säugerzellen sind beide Prinzipien weitgehend untersucht. In *S.cerevisiae* wurde bislang nur die Rezeptor-vermittelte Mitophagie dokumentiert. Neuste Studien demonstrieren, dass die Ubiquitin-vermittelte Eliminierung von Mitochondrien in Bäckerhefe prinzipiell möglich ist. Durch Expression der humanen E3-Ligase-Parkin in *S.cerevisiae* konnte eine erhöhte Mitophagie, sowie eine vermehrte Resistenz gegen oxidativem Stress gemessen werden (Pereira et al,

2015). Der molekulare Mechanismus und die Regulation des selektiven Abbaus von Mitochondrien sind trotzdem weitgehend unklar. Das Ziel dieser Arbeit war die Rolle der Ubiquitinierung und Deubiquitinierung in der Regulation der Mitophagie in *S.cerevisiae* zu bestimmen. In Kooperation mit Matthias Müller wurde der Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplex als negativer Modulator der Mitophagie und Aktivator der nicht-selektiven Autophagie identifiziert (Müller et al, 2015). Dieser Befund legt zum ersten Mal dar, dass die Ubiquitinierung an der Regulation des selektiven Abbaus von Mitochondrien beteiligt ist. Die nähere Charakterisierung des Enzymkomplexes im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass die katalytische Aktivität der Ubiquitin-spezifischen Protease Ubp3 essentiell für den Einfluss auf die Mitophagie und die nicht-selektive Autophagie ist. Zusammen mit der Translokation des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes vom Zytosol zu den Mitochondrien nach Rapamycin-induzierter Mitophagie, untermauern diese Ergebnisse die regulatorische Funktion des Enzymkomplexes in der selektiven Eliminierung von Mitochondrien. Die Deletion von *UBP3* führte zur massiven Reduktion an Deubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen nach Rapamycin-Behandlung. Dieses Resultat ist ein starker Beleg dafür, dass Ubp3 die Hauptdeubiquitinase ist, die an der mitochondrialen Außenmembran agiert und dadurch die Mitophagie hemmt. Interessanterweise war der Einfluss des Ubp3/Bre5-Deubiquitinase-Komplexes auf die Mitophagie abhängig von Atg32, da die Doppeldeletion von *ATG32* und *UBP3* bzw. *BRE5* einen Block an mtALP-Aktivität zeigte. Die Ubiquitin-vermittelte Mitophagie scheint demnach mit der Rezeptor-vermittelten Mitophagie verknüpft zu sein, abweichend von der Situation in Säugerzellen. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die Deletion des Polyubiquitin-kodierenden Gens *UBI4*, als einziges von drei nicht-essentiellen Ubiquitin-kodierenden Genen, zu einer Beeinträchtigung der Rapamycin-induzierten Mitophagie führte. *UBI1* und *UBI2* zeigten eine zum Teil reziproke Regulation der Ribophagie und einen Einfluss auf die ER-phagie. Diese Ergebnisse beweisen, dass diese zwei Ubiquitin-kodierenden Gene generell in der Lage sind Ubiquitin für eine selektive Form der Autophagie bereit zu stellen. Die Inhibition der Mitophagie durch Deletion von *UBI4* wurde auch für andere Induktionsmethoden (Wachstum in der stationären Phase und Stickstoffmangel) beobachtet und zeigt, dass der Einfluss sich nicht auf die Rapamycin-induzierte Mitophagie beschränkt. Zudem konnte die K48-Ubiquitinkettenverknüpfung, aber nicht K63, als notwendig für eine effektive Mitophagie-Aktivität identifiziert werden. Darüber hinaus war die inhibitorische Regulation des selektiven Abbaus von Mitochondrien vermittelt durch die Deubiquitinase

Ubp3 abhängig von *UBI4*. Die Hemmung der Mitophagie durch Deletion von *UBI4* wurde durch das zusätzliche Fehlen von *ATG32* verstärkt und zeigt ein weiteres Beispiel dafür auf, dass die Ubiquitin-vermittelte und die Rezeptor-vermittelte Mitophagie verknüpft sind. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nach dem Substrat der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie gesucht und das mitochondriale Außenmembranprotein Fzo1 identifiziert. Die Deletion von *FZO1* führte zu einer starken Reduktion der Mitophagie, die durch Expression des Proteins komplementiert werden konnte. In Säugerzellen konnte bereits eine ähnliche Rolle für das Fzo1 Ortholog, Mfn1/2, beobachtet werden (Gegg et al, 2010; Poole et al, 2010; Ziviani et al, 2010). Für die selektive Eliminierung von Mitochondrien waren die Ubiquitinierung von Fzo1, sowie das Lysinrest 464 erforderlich. Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Außenmembranfusion führte generell nicht zur Hemmung der Mitophagie. Eine vermehrte Ubiquitinierung von Fzo1 konnte im $\Delta ubp3$ Stamm nicht detektiert werden und ist vermutlich auf einen verstärkten proteasomalen Abbau zurückzuführen.

Zusammenfassung konnte ein Weg des selektiven Abbaus von Mitochondrien aufgezeigt werden, der dynamisch durch die *UBI4*-vermittelte Ubiquitinierung und *UBP3*-vermittelte Deubiquitinierung reguliert wird und Fzo1 als Substrat der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie beinhaltet. Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *S.cerevisiae* ein sehr nützlicher Modellorganismus für die Analyse der Regulation der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie und möglicher anderer Formen der selektiven Autophagie ist.

6 Summary

Mitochondria are double-membraned essential organelles whose function is the cellular production of ATP. As a by-product of ATP synthesis, reactive oxygen species (ROS) are generated which in addition to their function as a signaling molecule can also cause damage to mtDNA, lipids and proteins. Dysfunctional mitochondria are associated with numerous human diseases. The autosomal dominant optic atrophy type 1, cancer, Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A and 4A, diabetes and Parkinson's disease are only a few examples (Amati-Bonneau et al, 2008; Patti & Corvera, 2010; Schroder, 2006). In order to limit or prevent mitochondrial damage the cell has developed several quality control mechanisms (Ni et al, 2015). For example, molecular chaperones recognize misfolded proteins and are components of protein quality control. Whole mitochondria can be degraded via a selective type of autophagy called mitophagy. Autophagy is a cellular process in which cytoplasmic components are transported into the vacuole or lysosome (in mammals) and are degraded by hydrolases. Several selective types of autophagy as well as more than 40 Atg (autophagy-related) genes have been identified. Some are only responsible for specific types of autophagy. For example, the mitochondrial outer membrane protein Atg32 was identified as a receptor for the induction of mitophagy in yeast (Kanki et al, 2009b; Okamoto et al, 2009). In general, mitophagy can be classified into receptor-mediated and ubiquitin-mediated pathways (Tan et al, 2016). Both principles are extensively studied in mammals. In yeast only the receptor-mediated mitophagy has been discovered. Previous studies demonstrated that ubiquitin-mediated elimination of mitochondria is possible in principle. Expression of the human E3 ligase Parkin in *S.cerevisiae* showed increased mitophagy as well as increased resistance to oxidative stress (Pereira et al, 2015). Nevertheless, the molecular mechanism and the regulation of the selective degradation of mitochondria is mainly unclear. Therefore, the general aim of this study was to determine the role of ubiquitylation and deubiquitylation in the regulation of mitophagy in *S. cerevisiae*. In cooperation with Matthias Müller the Ubp3/Bre5-deubiquitinase-complex was identified to specifically inhibit mitophagy and simultaneously promote non-selective autophagy (Müller et al, 2015). This finding shows for the first time that ubiquitylation is involved in regulating mitophagy. The characterization of the enzyme complex shows that the catalytic activity of the ubiquitin-specific protease Ubp3

is essential for the influence on mitophagy and non-selective autophagy. Together with the translocation of the Ubp3/Bre5-deubiquitinase-complex from the cytosol to the mitochondria after rapamycin treatment (Müller et al, 2015) they support the regulatory function of the enzyme complex in mitophagy. The deletion of *UBP3* led to a massive reduction in deubiquitylation of mitochondrial proteins after rapamycin-induced mitophagy. This result is strong evidence that Ubp3 is the main deubiquitinase which acts upon the mitochondrial outer membrane and therefore inhibits mitophagy. Interestingly, the influence of the Ubp3/Bre5-deubiquitinase-complex on mitophagy was Atg32-dependent since the double deletion of *ATG32* and *UBP3* or *BRE5* showed a block of mtALP activity. Thus, ubiquitin-mediated mitophagy appears to be linked to receptor mediated mitophagy unlike the situation in mammals. Another important finding of this work is that the deletion of the polyubiquitin-encoding gene *UBI4* is the only one of three non-essential ubiquitin-encoding genes that leads to an impairment of rapamycin-induced mitophagy. *UBI1* and *UBI2* showed a partially reciprocal regulation of ribophagy and ER phagy. These results demonstrate that the two ubiquitin-encoding genes (*UBI1* and *UBI2*) are generally able to provide ubiquitin for a selective form of autophagy. The inhibition of mitophagy by deletion of *UBI4* was also observed for other mitophagy induction methods (stationary phase and nitrogen starvation) and shows that the effect is not limited to rapamycin-induced mitophagy. In addition, the K48 ubiquitin chain linkage but not K63 was required for mitophagy. The inhibitory regulation of the selective degradation of mitochondria mediated by the deubiquitinase Ubp3 was dependent on *UBI4*. The inhibition of mitophagy by deletion of *UBI4* was enhanced by the additional lack of *ATG32* and shows another example of the linkage of ubiquitin-mediated and receptor-mediated mitophagy. Furthermore, we searched for the substrate of ubiquitin-mediated mitophagy and identified the mitochondrial outer membrane protein Fzo1. Deletion of *FZO1* led to a strong reduction in mitophagy which was complemented by expression of the protein. A similar role for the Fzo1 ortholog, Mfn1/2, was observed in mammalian cells (Gegg et al, 2010; Poole et al, 2010; Ziviani et al, 2010). For the selective elimination of mitochondria the ubiquitylation of Fzo1 and lysine residue 464 were necessary. The impairment of mitochondrial fusion generally did not lead to the inhibition of mitophagy. An increased ubiquitylation of Fzo1 could not be detected in the $\Delta ubp3$ strain and is presumably due to increased proteasomal degradation.

In summary, a pathway of selective mitochondrial degradation was demonstrated which is dynamically regulated by *UBI4*-mediated ubiquitylation, *UBP3*-mediated deubiquitylation and Fzo1 as a substrate of ubiquitin-mediated mitophagy. Overall, *S.cerevisiae* has been shown to be a very useful model organism for the analysis of the regulation of ubiquitin-mediated mitophagy and possible other forms of selective autophagy.

7 Literaturverzeichnis

Abeliovich A, Flint Beal M (2006) Parkinsonism genes: culprits and clues. *Journal of neurochemistry* **99**: 1062-1072

Al Rawi S, Louvet-Vallee S, Djeddi A, Sachse M, Culetto E, Hajjar C, Boyd L, Legouis R, Galy V (2011) Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **334**: 1144-1147

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics* **26**: 211-215

Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, La Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martin MA, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D, Carelli V (2008) OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain : a journal of neurology* **131**: 338-351

Anton F, Dittmar G, Langer T, Escobar-Henriques M (2013) Two deubiquitylases act on mitofusin and regulate mitochondrial fusion along independent pathways. *Molecular cell* **49**: 487-498

Anton F, Fres JM, Schauss A, Pinson B, Praefcke GJ, Langer T, Escobar-Henriques M (2011) Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *Journal of cell science* **124**: 1126-1135

Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D (2011) Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Molecular biology of the cell* **22**: 3206-3217

Bauckman KA, Owusu-Boaitey N, Mysorekar IU (2015) Selective autophagy: xenophagy. *Methods* **75**: 120-127

Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **21**: 3329-3330

Bellu AR, Kiel JA (2003) Selective degradation of peroxisomes in yeasts. *Microsc Res Tech* **61**: 161-170

Bernhardt D, Müller M, Reichert AS, Osiewacz HD (2015) Simultaneous impairment of mitochondrial fission and fusion reduces mitophagy and shortens replicative lifespan. *Scientific reports* **5**: 7885

Bingol B, Tea JS, Phu L, Reichelt M, Bakalarski CE, Song Q, Foreman O, Kirkpatrick DS, Sheng M (2014) The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature* **510**: 370-375

- Bueler H (2010) Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **15**: 1336-1353
- Bursch W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Frohwein U, Schulte-Hermann R, Fazi B, Di Sano F, Piredda L, Piacentini M, Petrovski G, Fesus L, Gerner C (2008) Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology* **254**: 147-157
- Cebollero E, Reggiori F, Kraft C (2012) Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *International journal of cell biology* **2012**: 182834
- Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H (2007) Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends in cell biology* **17**: 563-569
- Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RL, Hess S, Chan DC (2011) Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* **20**: 1726-1737
- Chang CR, Blackstone C (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *The Journal of biological chemistry* **282**: 21583-21587
- Chen G, Han Z, Feng D, Chen Y, Chen L, Wu H, Huang L, Zhou C, Cai X, Fu C, Duan L, Wang X, Liu L, Liu X, Shen Y, Zhu Y, Chen Q (2014) A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular cell* **54**: 362-377
- Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, Han Z, Chen L, Gao R, Liu L, Chen Q (2016) Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* **12**: 689-702
- Chin LS, Li L (2016) Ubiquitin phosphorylation in Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and treatment. *Translational neurodegeneration* **5**: 1
- Chou CH, Lin CC, Yang MC, Wei CC, Liao HD, Lin RC, Tu WY, Kao TC, Hsu CM, Cheng JT, Chou AK, Lee CI, Loh JK, Howng SL, Hong YR (2012) GSK3beta-mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS one* **7**: e49112
- Clark BF, Marcker KA (1966) N-formyl-methionyl-sigma-ribonucleic acid and chain initiation in protein biosynthesis. Polypeptide synthesis directed by a bacteriophage ribonucleic acid in a cell-free system. *Nature* **211**: 378-380
- Clark SL, Jr. (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **3**: 349-362

Cornelissen T, Haddad D, Wauters F, Van Humbeeck C, Mandemakers W, Koentjoro B, Sue C, Gevaert K, De Strooper B, Verstreken P, Vandenberghe W (2014) The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy. *Hum Mol Genet* **23**: 5227-5242

Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S (2004) N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Molecular and cellular biology* **24**: 6140-6150

Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnoczky G (2010) Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular cell* **39**: 121-132

Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology* **14**: 70-77

Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, Tea JS, Yu C, Coons M, Kirkpatrick DS, Bingol B, Corn JE (2015) USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nature cell biology* **17**: 160-169

Dabeva MD, Post-Beittenmiller MA, Warner JR (1986) Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 5854-5857

Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT (2009) Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *The Journal of biological chemistry* **284**: 13843-13855

Davies V, Votruba M (2006) Focus on molecules: the OPA1 protein. *Experimental eye research* **83**: 1003-1004

Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* **302**: 819-822

Deffieu M, Bhatia-Kissova I, Salin B, Galinier A, Manon S, Camougrand N (2009) Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry* **284**: 14828-14837

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature genetics* **26**: 207-210

Deponte M (2012) GFP tagging sheds light on protein translocation: implications for key methods in cell biology. *Cell Mol Life Sci* **69**: 1025-1033

- Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology* **10**: 369-377
- Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW, 2nd, Yin XM (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *The Journal of biological chemistry* **285**: 27879-27890
- Durcan TM, Tang MY, Perusse JR, Dashti EA, Aguilera MA, McLelland GL, Gros P, Shaler TA, Faubert D, Coulombe B, Fon EA (2014) USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *The EMBO journal* **33**: 2473-2491
- Fang NN, Zhu M, Rose A, Wu KP, Mayor T (2016) Deubiquitinase activity is required for the proteasomal degradation of misfolded cytosolic proteins upon heat-stress. *Nature communications* **7**: 12907
- Feng Y, Backues SK, Baba M, Heo JM, Harper JW, Klionsky DJ (2016) Phosphorylation of Atg9 regulates movement to the phagophore assembly site and the rate of autophagosome formation. *Autophagy* **12**: 648-658
- Finley D, Bartel B, Varshavsky A (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**: 394-401
- Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**: 1035-1046
- Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **25**: 319-324.
- Frey TG, Renken CW, Perkins GA (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et biophysica acta* **1555**: 196-203
- Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, Noda NN (2014) Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature structural & molecular biology* **21**: 513-521
- Gadal O, Strauss D, Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E (2001) Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Molecular and cellular biology* **21**: 3405-3415
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation* **13**: 1423-1433
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* **19**: 4861-4870

Gerbitz KD, Gempel K, Brdiczka D (1996) Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* **45**: 113-126.

Gottlieb RA (2001) Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept* **10**: 147-161

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-1481

Harner M, Neupert W, Deponte M (2011) Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria. *Embo Journal* **30**: 3232-3241

Hasegawa J, Maejima I, Iwamoto R, Yoshimori T (2015) Selective autophagy: lysophagy. *Methods* **75**: 128-132

Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP (2009) MAM: more than just a housekeeper. *Trends in cell biology* **19**: 81-88

Heitman J, Movva NR, Hall MN (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909

Hofmann RM, Pickart CM (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**: 645-653

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 2563-2567

Hutchins MU, Klionsky DJ (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 20491-20498

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

Isasa M, Rose CM, Elsasser S, Navarrete-Perea J, Paulo JA, Finley DJ, Gygi SP (2015) Multiplexed, Proteome-Wide Protein Expression Profiling: Yeast Deubiquitylating Enzyme Knockout Strains. *Journal of proteome research* **14**: 5306-5317

Jackson SP, Durocher D (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Molecular cell* **49**: 795-807

Jensen RE, Hobbs AE, Cervený KL, Sesaki H (2000) Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc Res Tech* **51**: 573-583.

Jin SM, Youle RJ (2012) PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *Journal of cell science* **125**: 795-799

Jin YN, Johnson GV (2010) The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **42**: 199-205

Journo D, Mor A, Abeliovich H (2009) Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy. *The Journal of biological chemistry* **284**: 35885-35895

Juhasz G, Neufeld TP (2006) Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS biology* **4**: e36

Kanki T, Klionsky DJ (2008) Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *The Journal of biological chemistry* **283**: 32386-32393

Kanki T, Klionsky DJ (2010) The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Molecular microbiology* **75**: 795-800

Kanki T, Klionsky DJ, Okamoto K (2011) Mitochondria autophagy in yeast. *Antioxid Redox Signal* **14**: 1989-2001

Kanki T, Kurihara Y, Jin X, Goda T, Ono Y, Aihara M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T, Kang D (2013) Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO reports* **14**: 788-794

Kanki T, Wang K, Baba M, Bartholomew CR, Lynch-Day MA, Du Z, Geng J, Mao K, Yang Z, Yen WL, Klionsky DJ (2009a) A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Molecular biology of the cell* **20**: 4730-4738

Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ (2009b) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental cell* **17**: 98-109

Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y (2008) Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Molecular biology of the cell* **19**: 2039-2050

Kazlauskaite A, Kondapalli C, Gurlay R, Campbell DG, Ritorto MS, Hofmann K, Alessi DR, Knebel A, Trost M, Muqit MM (2014) Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J* **460**: 127-139

Kazlauskaite A, Martinez-Torres RJ, Wilkie S, Kumar A, Peltier J, Gonzalez A, Johnson C, Zhang J, Hope AG, Peggie M, Trost M, van Aalten DM, Alessi DR, Prescott AR, Knebel A, Walden H, Muqit MM (2015) Binding to serine 65-phosphorylated ubiquitin primes Parkin for optimal PINK1-dependent phosphorylation and activation. *EMBO reports* **16**: 939-954

Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I (2009) NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* **5**: 732-733

Kissova I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**: 39068-39074

Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science* **118**: 7-18

Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, Matsunami M, Hashimoto A, Inagaki F, Ohsumi Y, Okamoto K (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *The Journal of biological chemistry* **287**: 10631-10638

Koob S, Reichert AS (2014) Novel intracellular functions of apolipoproteins: the ApoO protein family as constituents of the Mitofilin/MINOS complex determines cristae morphology in mitochondria. *Biological chemistry* **395**: 285-296

Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**: 858-862

Kotiadis VN, Duchen MR, Osellame LD (2014) Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochimica et biophysica acta* **1840**: 1254-1265

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

Kumar A, Aguirre JD, Condos TE, Martinez-Torres RJ, Chaugule VK, Toth R, Sundaramoorthy R, Mercier P, Knebel A, Spratt DE, Barber KR, Shaw GS, Walden H (2015) Disruption of the autoinhibited state primes the E3 ligase parkin for activation and catalysis. *The EMBO journal* **34**: 2506-2521

Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1928-1939

Lang BF, Gray MW, Burger G (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* **33**: 351-397

Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* **524**: 309-314

Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* **8**: 3-5

- Li K, Ossareh-Nazari B, Liu X, Dargemont C, Marmorstein R (2007) Molecular basis for bre5 cofactor recognition by the ubp3 deubiquitylating enzyme. *Journal of molecular biology* **372**: 194-204
- Li K, Zhao K, Ossareh-Nazari B, Da G, Dargemont C, Marmorstein R (2005) Structural basis for interaction between the Ubp3 deubiquitinating enzyme and its Bre5 cofactor. *The Journal of biological chemistry* **280**: 29176-29185
- Li L, Xu J, Chen L, Jiang Z (2016) Receptor-mediated reticulophagy: a novel promising therapy target for diseases. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **48**: 774-776
- Lill R, Kispal G (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **25**: 352-356
- Lipatova Z, Shah AH, Kim JJ, Mulholland JW, Segev N (2013) Regulation of ER-phagy by a Ypt/Rab GTPase module. *Molecular biology of the cell* **24**: 3133-3144
- Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, Cai Y, Norberg HV, Zhang T, Furuya T, Jin M, Zhu Z, Wang H, Yu J, Li Y, Hao Y, Choi A, Ke H, Ma D, Yuan J (2011) Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147**: 223-234
- Liu L, Sakakibara K, Chen Q, Okamoto K (2014) Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell research* **24**: 787-795
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11364-11369
- Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Botstein D (1987) Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**: 201-216
- Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* **3**: 374-376
- Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J (1994) The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech* **27**: 278-283
- Mao K, Wang K, Liu X, Klionsky DJ (2013) The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Developmental cell* **26**: 9-18
- Margulis L (1971) Symbiosis and evolution. *Scientific American* **225**: 48-57
- Martin S, Bellora N, Gonzalez-Vallinas J, Irimia M, Chebli K, de Toledo M, Raabe M, Eyraas E, Urlaub H, Blencowe BJ, Tazi J (2016) Preferential binding of a stable G3BP ribonucleoprotein complex to intron-

retaining transcripts in mouse brain and modulation of their expression in the cerebellum. *Journal of neurochemistry* **139**: 349-368

McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A (1991) UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *The EMBO journal* **10**: 227-236

Mendl N, Occhipinti A, Muller M, Wild P, Dikic I, Reichert AS (2011) Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2. *Journal of cell science* **124**: 1339-1350

Milkereit P, Strauss D, Bassler J, Gadai O, Kuhn H, Schutz S, Gas N, Lechner J, Hurt E, Tschochner H (2003) A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *The Journal of biological chemistry* **278**: 4072-4081

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148

Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell death and differentiation* **12 Suppl 2**: 1535-1541

Mizushima N (2011) Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **76**: 397-402

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**: 395-398

Moazed D, Johnson D (1996) A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* **86**: 667-677

Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2015) Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**: 359-362

Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**: 201-205

Müller M, Kotter P, Behrendt C, Walter E, Scheckhuber CQ, Entian KD, Reichert AS (2015) Synthetic quantitative array technology identifies the ubp3-bre5 deubiquitinase complex as a negative regulator of mitophagy. *Cell Rep* **10**: 1215-1225

Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K (2015) Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nature communications* **6**: 7527

Nakatogawa H, Mochida K (2015) Reticulophagy and nucleophagy: New findings and unsolved issues. *Autophagy* **11**: 2377-2378

Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ (2010) p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* **6**: 1090-1106

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* **183**: 795-803

Narendra D, Walker JE, Youle R (2012) Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**: a011338

Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**: 481-490

Ni HM, Williams JA, Ding WX (2015) Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology* **4**: 6-13

Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**: 773-786

Nikaido H, Rosenberg EY (1981) Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of Escherichia coli. *The Journal of general physiology* **77**: 121-135

Nikaido H, Song SA, Shaltiel L, Nurminen M (1976) Outer membrane of Salmonella XIV. Reduced transmembrane diffusion rates in porin-deficient mutants. *Biochemical and biophysical research communications* **76**: 324-330

Nostramo R, Herman PK (2016) Deubiquitination and the regulation of stress granule assembly. *Current genetics* **62**: 503-506

Nostramo R, Varia SN, Zhang B, Emerson MM, Herman PK (2016) The Catalytic Activity of the Ubp3 Deubiquitinating Protease Is Required for Efficient Stress Granule Assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and cellular biology* **36**: 173-183

Nowikovsky K, Reipert S, Devenish RJ, Schweyen RJ (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell death and differentiation* **14**: 1647-1656

Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P (1997) Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular biology of the cell* **8**: 1233-1242

Obara K, Ohsumi Y (2008) Dynamics and function of PtdIns(3)P in autophagy. *Autophagy* **4**: 952-954

Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental cell* **17**: 87-97

Okatsu K, Koyano F, Kimura M, Kosako H, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *The Journal of cell biology* **209**: 111-128

Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature genetics* **28**: 272-275

Orth M, Schapira AH (2001) Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* **106**: 27-36

Osiewacz HD, Bernhardt D (2013) Mitochondrial quality control: impact on aging and life span - a mini-review. *Gerontology* **59**: 413-420

Ossareh-Nazari B, Nino CA, Bengtson MH, Lee JW, Joazeiro CA, Dargemont C (2014) Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. *The Journal of cell biology* **204**: 909-917

Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ, Varshavsky A (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *The EMBO journal* **6**: 1429-1439

Patti ME, Corvera S (2010) The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* **31**: 364-395

Pereira C, Costa V, Martins LM, Saraiva L (2015) A yeast model of the Parkinson's disease-associated protein Parkin. *Experimental cell research* **333**: 73-79

Poole AC, Thomas RE, Yu S, Vincow ES, Pallanck L (2010) The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PloS one* **5**: e10054

Priault M, Salin B, Schaeffer J, Vallette FM, di Rago JP, Martinou JC (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell death and differentiation* **12**: 1613-1621

Prinz WA, Grzyb L, Veenhuis M, Kahana JA, Silver PA, Rapoport TA (2000) Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **150**: 461-474

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

Robzyk K, Kassir Y (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic acids research* **20**: 3790

- Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of cell science* **115**: 1663-1674
- Ross JM, Stewart JB, Hagstrom E, Brene S, Mourier A, Coppotelli G, Freyer C, Lagouge M, Hoffer BJ, Olson L, Larsson NG (2013) Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature* **501**: 412-415
- Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, Roesley SN, Sarcevic B (2012) Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB life* **64**: 136-142
- Saeki Y, Kudo T, Sone T, Kikuchi Y, Yokosawa H, Toh-e A, Tanaka K (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *The EMBO journal* **28**: 359-371
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**: 232-235
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467
- Sato M, Sato K (2011) Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* **334**: 1141-1144
- Sauve V, Lilov A, Seirafi M, Vranas M, Rasool S, Kozlov G, Sprules T, Wang J, Trempe JF, Gehring K (2015) A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *The EMBO journal* **34**: 2492-2505
- Schäfer A, Reichert AS (2009) Emerging roles of mitochondrial membrane dynamics in health and disease. *Biological chemistry* **390**: 707-715
- Schroder JM (2006) Neuropathology of Charcot-Marie-Tooth and related disorders. *Neuromolecular Med* **8**: 23-42
- Schuck S, Gallagher CM, Walter P (2014) ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *Journal of cell science* **127**: 4078-4088
- Sesaki H, Jensen RE (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *The Journal of cell biology* **147**: 699-706.

- Shiba-Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, Inoshita T, Yoshida S, Ishihama Y, Ryu KY, Nukina N, Hattori N, Imai Y (2014) Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering. *PLoS Genet* **10**: e1004861
- Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002) Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Developmental cell* **3**: 825-837
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27
- Sokol AM, Sztolsztener ME, Wasilewski M, Heinz E, Chacinska A (2014) Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS letters* **588**: 2484-2495
- Sole C, Nadal-Ribelles M, Kraft C, Peter M, Posas F, de Nadal E (2011) Control of Ubp3 ubiquitin protease activity by the Hog1 SAPK modulates transcription upon osmostress. *The EMBO journal* **30**: 3274-3284
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer research* **61**: 6669-6673
- Strous GJ, Govers R (1999) The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *Journal of cell science* **112 (Pt 10)**: 1417-1423
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO journal* **20**: 5971-5981
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **12**: 209-218
- Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M (2013) Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Molecular and cellular biology* **33**: 815-829
- Tal R, Winter G, Ecker N, Klionsky DJ, Abeliovich H (2007) Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *The Journal of biological chemistry* **282**: 5617-5624

- Tan T, Zimmermann M, Reichert AS (2016) Controlling quality and amount of mitochondria by mitophagy: insights into the role of ubiquitination and deubiquitination. *Biological chemistry* **397**: 637-647
- Tasdemir E, Maiuri MC, Tajeddine N, Vitale I, Criollo A, Vicencio JM, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007) Cell cycle-dependent induction of autophagy, mitophagy and reticulophagy. *Cell cycle* **6**: 2263-2267
- Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews Genetics* **6**: 389-402
- Trumbly RJ, Bradley G (1983) Isolation and characterization of aminopeptidase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **156**: 36-48
- Truscott KN, Bezawork-Geleta A, Dougan DA (2011) Unfolded protein responses in bacteria and mitochondria: a central role for the ClpXP machine. *IUBMB life* **63**: 955-963
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008a) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* **27**: 433-446
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS (2008b) Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochimica et biophysica acta* **1777**: 1092-1097
- Vance JE (2003) Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **75**: 69-111
- Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK (2012) Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 56-66
- Waite KA, De-La Mota-Peynado A, Vontz G, Roelofs J (2016) Starvation Induces Proteasome Autophagy with Different Pathways for Core and Regulatory Particles. *The Journal of biological chemistry* **291**: 3239-3253
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**: 1482-1488
- Wang CW, Klionsky DJ (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Molecular medicine* **9**: 65-76
- Wang K, Jin M, Liu X, Klionsky DJ (2013) Proteolytic processing of Atg32 by the mitochondrial i-AAA protease Yme1 regulates mitophagy. *Autophagy* **9**: 1828-1836
- Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* **15**: 2922-2933

Wang X, Herr RA, Chua WJ, Lybarger L, Wiertz EJ, Hansen TH (2007) Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mk3. *The Journal of cell biology* **177**: 613-624

Wang Y, Serricchio M, Jauregui M, Shanbhag R, Stoltz T, Di Paolo CT, Kim PK, McQuibban GA (2015) Deubiquitinating enzymes regulate PARK2-mediated mitophagy. *Autophagy* **11**: 595-606

Weidberg H, Shvets E, Elazar Z (2009) Lipophagy: selective catabolism designed for lipids. *Developmental cell* **16**: 628-630

Weissman AM, Shabek N, Ciechanover A (2011) The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 605-620

Winklhofer KF (2014) Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends in cell biology* **24**: 332-341

Wolstenholme DR (1992) Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. *Current opinion in genetics & development* **2**: 918-925

Wu W, Lin C, Wu K, Jiang L, Wang X, Li W, Zhuang H, Zhang X, Chen H, Li S, Yang Y, Lu Y, Wang J, Zhu R, Zhang L, Sui S, Tan N, Zhao B, Zhang J, Li L, Feng D (2016) FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics at the ER-mitochondrial contact site under hypoxic conditions. *The EMBO journal* **35**: 1368-1384

Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**: 133-145

Yang S, Rosenwald AG (2014) The roles of monomeric GTP-binding proteins in macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of molecular sciences* **15**: 18084-18101

Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell* **17**: 5094-5104

Yang Z, Klionsky DJ (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* **335**: 1-32

Young MJ, Court DA (2008) Effects of the S288c genetic background and common auxotrophic markers on mitochondrial DNA function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**: 903-912

Yuga M, Gomi K, Klionsky DJ, Shintani T (2011) Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **286**: 13704-13713

Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, Novak I, Dikic I, Hamacher-Brady A, Brady NR (2013) Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **288**: 1099-1113

Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1793**: 5-19

Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ (2010) Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 5018-5023

8 Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atg	Autophagie-assoziierte Proteine
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CJ	<i>Crista junctions</i>
cm	Zentimeter
Cvt	<i>Cytoplasm to vacuole targeting</i>
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinase
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-ethansulfonsäure
His	Histamin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IP	Immunopräzipitation
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

l	Liter
LB	Luria Bertani
LEU	Leucin
m	Minute
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membran
ml	Milliliter
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
n	Anzahl der Durchführungen
nat	Nourseothricin
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	<i>phagophore assembly site</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
Pi	anorganisches Phosphat
PIPES	1,4'-Piperazin-N,N'-Diethansulfonsäure
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Selektionsmedium enthält Glukose
SG	Selektionsmedium enthält Glycerin
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>

TOR	<i>target of rapamycin</i>
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
URA	Uracil
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel

9 Danksagung

Es ist geschafft, meine Doktorarbeit ist beendet!!!!

Zuerst möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Andreas Reichert für das interessante Forschungsprojekt sowie seine engagierte wissenschaftliche Betreuung bedanken. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, sowie sein Vertrauen in mich haben die Anfertigung meiner Doktorarbeit erleichtert.

Bei meinem Betreuer Prof. Dr. Lutz Schmitt möchte ich mich ganz herzlich für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Kollegen Matthias Müller, der mich vor allem zu Beginn meiner Arbeit unterstützte und mir das Projekt übergeben hat. Durch seine hervorragende wissenschaftliche Einarbeitung in das Thema und in die Methoden wurde mir der Einstieg in das Projekt sehr erleichtert.

Weiterhin danke ich meinem Arbeitskollegen Marcel Zimmermann für die Korrektur dieser Dissertation.

Mein außerordentlicher Dank gilt den technischen Assistentinnen Gisela Pansegrau und Tanja Portugall, die mich in zahlreichen Experimenten unterstützt haben. Ganz besonders werde ich Gisela's „spezielles Getränk“ in verlockender Erinnerung behalten.

Ein spezielles Dankeschön geht auch an die Arbeitsgruppe „Brenneisen“ für die produktiven Nachmittagsmeetings. Vielen Dank an dieser Stelle an Maren Zschauer, Elif Aplak, Sabine Siegert und Claudia Wyrich für die zahlreichen Aufmunterungen und witzigen Gespräche. Ein herzliches Dankeschön gilt auch den Professoren Dr. Brenneisen und Dr. Stahl für die anregenden Diskussionen und Ideen unter anderem in die Institutsmeetings. Danke der gesamten Arbeitsgruppe für die kritischen anregenden Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Bruder Alexander, der mich nach jedem Rückschlag aufbaute und mir Mut machte, weiter am Ball zu bleiben. Nicht zuletzt danke ich meiner ganzen Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und mir zur Seite gestanden haben. Ihre tatkräftige Unterstützung und Motivation, die auch in den letzten zwei Jahren der Doktorarbeit trotz der großen Entfernung nicht nachließen, erleichterten mir die Anfertigung meiner Dissertation.

Ihnen und euch allen danke, danke, danke.....

Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, Christina Behrendt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 23.03.2017

Christina Behrendt