

**Einfluss der mitochondrialen Morphologie und der allgemeinen
Stressantwort auf die Mitophagie in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Nadine Mendl

aus
Rochlitz

München
2010

Dissertation eingereicht am: 30.11.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll
2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht
Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2011

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Struktur und Funktion von Mitochondrien	1
1.2 Mitochondriale Dynamik	3
1.2.1 Mechanismus der mitochondrialen Fusion	4
1.2.2 Der Mechanismus der mitochondrialen Teilung	6
1.3 Die Vakuole	9
1.4 Die generelle Stressantwort	10
1.5 Autophagie	11
1.5.1 Der TOR-Kinase-Komplex und Rapamycin	12
1.5.2 Makroautophagie	14
1.5.3 Mikroautophagie	17
1.5.4 Selektive Formen von Autophagie	18
1.5.4.1 Der Cvt-Weg	18
1.5.4.2 Pexophagie	19
1.5.4.3 Mitophagie	20
1.6 Zielsetzung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Chemikalien und Geräte	24
2.1.1 Chemikalien	24
2.1.2 Geräte	27
2.2 Kulturmedien	28
2.3 Molekularbiologische Methoden	29
2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.3.2 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.3.3 Agarosegelelektrophorese	31
2.3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.3.5 Restriktionsverdau von DNA	31
2.3.6 Ligation von DNA	32
2.3.7 Präparation transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	32
2.3.8 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	32
2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.3.10 Ethanol-fällung	33
2.3.11 Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.3.12 DNA-Sequenzierung	34
2.3.13 Klonierungsstrategien	34

2.4 Methoden der Hefegenetik	37
2.4.1 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	37
2.4.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	40
2.4.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit DNA	41
2.4.4 Gendelektionen in <i>S. cerevisiae</i>	42
2.4.4.1 Deletion von <i>PHO8</i>	42
2.4.4.2 Deletion von <i>FIS1</i> im W303-Stammhintergrund	42
2.5 Zellbiologische Methoden	43
2.5.1 Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> über Amylose-Resin	43
2.5.2 Färbung des Zytoskeletts in <i>S. cerevisiae</i>	43
2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie	44
2.5.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	44
2.5.5 Gesamtproteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	45
2.5.6 Subfraktionierung von Hefezellen	45
2.5.7 Sublokalisierung der alkalischen Phosphatase	47
2.5.8 Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie mittels Aktivierung von zytosolischer oder mitochondrial lokalisierter alkalischer Phosphatase (ALP-Assay)	47
2.6 Proteinchemische Methoden	48
2.6.1 Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase	48
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.6.4 Proteintransfer aus Gelen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)	50
2.7 Immunologische Methoden	50
2.7.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper in Kaninchen	50
2.7.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern	51
2.7.3 Immundetektion von Proteinen	52
3 ERGEBNISSE	53
3.1 Validierung der enzymatischen Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie	53
3.1.1 Lokalisation der alkalischen Phosphatase	53
3.1.2 Bestimmung der unspezifischen ALP Aktivierung	55
3.1.3 Validierung des Zellaufschlusses mit dem Zellohomogenisator Precellys® 24	56
3.1.4 Der ALP-Assay ermöglicht die quantitative und vergleichbare Messung von Autophagie und Mitophagie	58
3.2 Die Abhängigkeit der Mitophagie von bekannten Faktoren der Autophagie	60
3.2.1 Die Rapamycin-induzierte Mitophagie ist eine selektive Form der Autophagie	60
3.2.2 Mitophagie ist nicht abhängig von Uth1 oder Aup1	63
3.3 Der Zusammenhang zwischen Mitophagie und mitochondrialer Morphologie	64
3.3.1 Mitophagie resultiert nicht in mitochondrialer Fragmentierung	64
3.3.2 Mitophagie wird nicht durch Fragmentierung von Mitochondrien induziert	65
3.3.3 Mitophagie ist unabhängig von der mitochondrialen Teilungsmaschinerie	69
3.4 Effekt der <i>fis1</i>-Deletion auf Mitophagie ist bedingt durch eine sekundäre Mutation in <i>WHISKEY2</i>	76

3.4.1 $\Delta fis1^*$ weist eine Mutation in <i>WHISKEY2</i> auf	76
3.4.2 Mitophagie ist abhängig von <i>WHISKEY2</i>	77
3.4.3 Der Mitophagiedefekt in $\Delta fis1^*$ wird durch Expression von <i>WHI2</i> kompensiert	79
3.4.4 In einem $\Delta fis1$ -Stamm ohne <i>WHI2</i> -Mutation sind Mitophagie und Autophagie nicht beeinträchtigt	81
3.5 Der Einfluss von <i>Whiskey2</i> auf die Mitophagie	83
3.5.1 Der Cvt-Weg ist nicht abhängig von <i>Whi2</i>	83
3.5.2 Das Zytoskelett ist in $\Delta whi2$ durch Rapamycin-Behandlung nicht beeinträchtigt	84
3.5.3 Die generelle Stressantwort hat einen Einfluss auf Mitophagie und Autophagie	85
3.5.4 Mitophagie könnte wie Autophagie über den PKA-Signaltransduktionsweg reguliert werden	87
4 DISKUSSION	90
4.1 Rapamycin induziert selektive Mitophagie	90
4.2 Induktion der Mitophagie resultiert nicht in Fragmentierung der Mitochondrien	92
4.3 Mitophagie wird nicht durch Fragmentierung der Mitochondrien induziert	92
4.4 Die mitochondriale Teilung ist keine Grundvoraussetzung für Rapamycin-induzierte Mitophagie	93
4.5 Der Einfluss der Morphologie auf Mitophagie ist in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Säugern verschieden	95
4.6 Die Deletion von <i>FIS1</i> resultiert in der Akkumulation einer Mutation in <i>WHI2</i>	96
4.7 <i>Whiskey2</i> beeinflusst die Induktion von Mitophagie und Autophagie	98
5 ZUSAMMENFASSUNG	104
6 SUMMARY	106
7 LITERATURVERZEICHNIS	108
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
9 DANKSAGUNG	120

1. Einleitung

1.1 Struktur und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien übernehmen einen Großteil der Energiebereitstellung in Form von ATP über den Zitronensäurezyklus und die oxidative Phosphorylierung (Mitchell, 1961; Saraste, 1999). Weitere Funktionen sind die Bildung von Eisen-Schwefel-Zentren (Lill und Kispal, 2000), die Biosynthese von Häm, der Abbau von Fettsäuren, die Stickstoffentgiftung durch Harnstoffsynthese und die Kalzium-Homöostase (Scheffler, 1999). Die Evolution der Mitochondrien geht auf einen Endosymbiose-Prozess zurück, bei dem ein Eubakterium von einer eukaryotischen Vorläuferzelle aufgenommen wurde (Margulis, 1971; Gray et al., 1999). Daher verfügen Mitochondrien über ein eigenes Genom mit eigenständiger Proteinsynthese. Im Laufe der Evolution wurde der Großteil der Gene von der mitochondrialen DNA in den Zellkern transferiert. Der prinzipielle Aufbau, das Proteom, und die Funktionsweise von Mitochondrien sind in allen Eukaryoten weitgehend konserviert. Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossen, wobei die mitochondriale Innenmembran die mitochondriale Matrix umschließt und mehrfache Einstülpungen, die Cristae, aufweist (Abbildung 1). Daraus ergibt sich die Einteilung der Innenmembran in Innere Grenzmembran und Cristamembran. Die Cristamembran umfasst die Einstülpung der Innenmembran in die Matrix und ist von der inneren Grenzmembran durch *Crista junctions* abgetrennt. Auf Grund dieser Struktur und der unterschiedlichen Verteilung von Proteinen zwischen Grenzmembran und Cristamembran könnte der Intracristaraum ein funktionell eigenständiges Reaktionskompartiment darstellen (Mannella et al., 1997; Vogel et al., 2006). Zwischen der Innenmembran und der Außenmembran befindet sich der Intermembranraum.

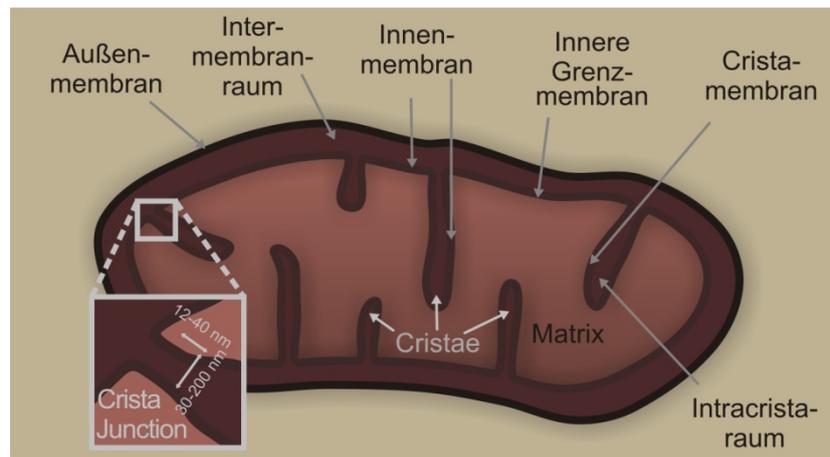


Abbildung 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Ultrastruktur (adaptiert nach Zick und Reichert, 2010). Mitochondrien besitzen eine Außenmembran und eine vielfach gefaltete Innenmembran. Die Innenmembran unterteilt sich in die innere Grenzmembran und die Crista-Membran, welche die Einstülpungen in die Matrix umschließt. Den Übergang von der Inneren Grenzmembran zur Cristamembran bilden die Crista-Junctions.

Mitochondrien haben eine hohe Dichte an Proteinen (Sickmann et al., 2003; Prokisch et al., 2004). Da diese jedoch hauptsächlich im Zellkern kodiert sind, gibt es eine Reihe von mitochondrialen Translokasen, welche die Sortierung von Proteinen in das entsprechende Kompartiment vermitteln (Neupert, 1997). Mitochondriale Proteine werden im Zytosol an freien Ribosomen synthetisiert und weisen typische Signalsequenzen auf, welche spezifisch mit der entsprechenden Translokase interagieren. In Bäckerhefe wurden bisher zwei Translokasen in der Außenmembran identifiziert, der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane of mitochondria*), welcher den Transport über und in die Außenmembran vermittelt (Neupert, 1997; Ryan et al., 2000), und der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane beta-barrel proteins*), welcher für die Insertion von β -barrel Proteinen in die Außenmembran verantwortlich ist (Waizenegger et al., 2004; Paschen et al., 2005). Lösliche Proteine des Intermembranraums, die keine eindeutige Signalsequenz jedoch ein konserviertes Cystein-Motiv aufweisen, werden über ein Disulfidbrücken-Transfersystem über Mia40 und Erv1 importiert (Mesecke et al., 2005). Proteine mit einer N-terminalen Signalsequenz werden nach Durchqueren des TOM-Komplexes über die TIM23-Translokase (*translocase of the inner membrane of mitochondria*) in die Matrix oder bei Vorhandensein eines hydrophoben Bereichs nach der Signalsequenz in die Innenmembran sortiert (Glick et al., 1992; Rojo et al., 1998). Alternativ werden beim konservativen Sortierungsweg Proteine zunächst über die TIM23-

Translokase in die Matrix transportiert und anschließend über Oxa1 in die Innenmembran inseriert. Mitochondrial kodierte Proteine, welche in der Matrix an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden, werden ebenfalls über Oxa1 in die Innenmembran inseriert (Hell et al., 1998; Hell et al., 2001). Proteine mit internen Signalsequenzen werden über die TIM22-Translokase in die Innenmembran importiert (Sirrenberg et al., 1996).

1.2 Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind keine isolierten Organellen wie zum Beispiel der Zellkern oder die Vakuole, sondern liegen als schlauchförmige, verzweigte Membrannetzwerke vor. Dieses tubuläre Netzwerk wird durch ein Gleichgewicht an häufigen Teilungs- und Fusionsvorgängen aufrechterhalten, die durch mehrere Dynamin-ähnliche Proteine gesteuert werden (Bereiter-Hahn und Voth, 1994; Nunnari *et al.*, 1997). Die mitochondriale Morphologie einer Zelle ist von äußeren Bedingungen und in höheren Eukaryoten von der Zelldifferenzierung abhängig. Entsprechend unterscheiden sich Organismen und Gewebe in der Morphologie ihrer Mitochondrien (Frey und Mannella, 2000). Separierte Mitochondrien sind für den Transport in die Synapsen innerhalb von Neuronen und während der Zellteilung notwendig. Desweiteren spielt die mitochondriale Teilung eine Rolle bei der Apoptose, da sie der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien vorausgeht (Frank et al., 2001). Die Fusion von Mitochondrien ist für die Vererbung von mitochondrialer DNA (mtDNA) auf Tochterzellen essenziell (Guan *et al.*, 1993; Shepard und Yaffe, 1999). Sie bewirkt desweiteren die Durchmischung des Gen- und Proteinpools innerhalb einer Zelle, wodurch Schäden kompensiert werden können (Nakada et al., 2001; Ono et al., 2001). Defekte in der Teilung von Mitochondrien resultieren in einem einzigen verzweigten Netzwerk pro Zelle, während Defekte in der Fusion zu einer fragmentierten Morphologie führen (Abbildung 2). Mitochondriale Fragmente tendieren weiterhin zur Aggregation, was wahrscheinlich auf das dem Fusionsprozess vorausgehende, noch funktionierende Andocken der Außenmembranen zurückzuführen ist (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998).

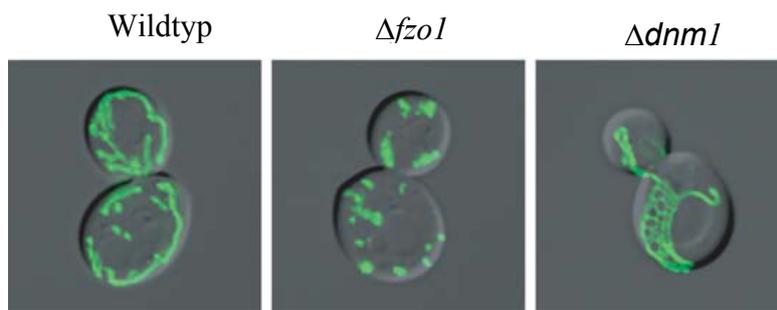


Abbildung 2: Die mitochondriale Morphologie wird durch ein Gleichgewicht an Fusion und Teilung aufrechterhalten. Die angegebenen Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthielten mitochondrial lokalisiertes GFP (Green Fluorescent Protein) und wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Für die Darstellung wurden Fluoreszenzaufnahmen mit Phasenkontrastaufnahmen überlagert (Okamoto und Shaw, 2005).

1.2.1 Mechanismus der mitochondrialen Fusion

Die Fusion von Mitochondrien besteht aus der Fusion der Außenmembran und der Fusion der Innenmembran. Beide Prozesse sind miteinander gekoppelt, laufen jedoch zeitlich versetzt ab. Damit sind individuelle Komponenten für die Fusion der jeweiligen Membranen notwendig, welche untereinander interagieren und die Fusionen koordinieren können. Weiterhin laufen die beiden Fusionsprozesse unter unterschiedlichen energetischen Voraussetzungen ab. Während für die Fusion der Außenmembran ein Protonengradient über die Innenmembran notwendig ist, benötigt die Innenmembranfusion zusätzlich ein elektrochemisches Potential über die Innenmembran. In Studien in *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) wurden bisher drei Faktoren für die mitochondriale Fusion charakterisiert, Fzo1, Ugo1 und Mgm1. Die Deletion eines dieser Gene führt zu einer fragmentierten bzw. aggregierten mitochondrialen Morphologie und zum Verlust von mtDNA. Das Protein Fzo (fuzzy onion) wurde zunächst in *Drosophila melanogaster* identifiziert. Eine Mutation im kodierenden Bereich für Fzo führte zu einer zwiebelähnlichen mitochondrialen Ultrastruktur, woraus der Name „fuzzy onion“ resultiert (Hales und Fuller, 1997). Fzo1 ist ein Dynamin-ähnliches Protein mit zwei Transmembrandomänen, welche Fzo1 in der mitochondrialen Außenmembran verankern (Abbildung 3). Demnach ist sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus mit der konservierten GTPase-Domäne und den Oligomerisierungsmotiven zum Zytoplasma hin orientiert (Fritz et al., 2001). Über die Homooligomerisierung dient Fzo1 dem Andocken von zwei mitochondrialen Außenmembranen beim Fusionsprozess (Hermann et al., 1998).

Dazu muss Fzo1 mit einer funktionellen GTPase-Domäne an beiden Außenmembranen vorhanden sein. Für Fzo1 wurden zwei Säugerhomologe, Mitofusin 1 und Mitofusin 2, charakterisiert, welche zum Teil redundante Funktionen in der Fusion besitzen. Jedoch führt die Deletion von Mitofusin 1 zu einer reduzierten Fusion, was auf verschiedene Funktionen der Proteine hindeutet (Santel und Fuller, 2001; Ishihara *et al.*, 2004). Ein weiteres Dynamin-ähnliches Protein, Mgm1, ist für die Fusion der mitochondrialen Innenmembran notwendig. Entsprechend ist Mgm1 in die mitochondriale Innenmembran integriert bzw. mit dieser assoziiert, wobei sich der Hauptteil des Proteins im Intermembranraum befindet. Mgm1 existiert in zwei verschiedenen Isoformen, l-Mgm1 und s-Mgm1, welche durch „Alternative Topogenese“ gebildet werden (Herlan *et al.*, 2003; Herlan *et al.*, 2004). Dabei erfolgt der Import von Mgm1 zunächst über die TIM23-Translokase, wobei die Signalsequenz durch MPP abgespalten wird. Die anschließende Insertion von Mgm1 über das erste hydrophobe Segment resultiert in l-Mgm1. Wird das Protein jedoch in Abhängigkeit von ATP weiter in die Matrix transloziert bis sich das zweite hydrophobe Segment in der Translokase befindet, kommt es zu einer weiteren Proteolyse durch Pcp1, wodurch s-Mgm1 entsteht. Unter physiologischen Bedingungen werden beide Formen in einem Verhältnis von etwa 1:1 gebildet. Für die Fusion der Innenmembran sind beide Isoformen in diesem Verhältnis notwendig (Herlan *et al.*, 2003). Das weist daraufhin, dass die beiden Isoformen unterschiedliche Funktionen in der Fusion besitzen. Neueste Ergebnisse zeigen, dass nur in s-Mgm1 die GTPase-Aktivität essenziell für die Fusion ist (DeVay *et al.*, 2009; Zick *et al.*, 2009). Weiterhin wurde in diesen Untersuchungen beobachtet, dass l-Mgm1 die GTPase-Aktivität von s-Mgm1 stimuliert. Das deutet daraufhin, dass l-Mgm1 eine Funktion in der Membranverankerung ausübt. Die Funktion von l-Mgm1 sowie der genaue Mechanismus der Innenmembranfusion sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Ebenso ist noch nicht ausreichend geklärt, wie die Bildung beider Isoformen im Verhältnis 1:1 reguliert wird. Einen entscheidenden Einfluss hat dabei jedoch die energetische Bilanz der Mitochondrien. Für die Bildung von s-Mgm1 sind beispielsweise höhere Mengen an ATP notwendig als für l-Mgm1 (Herlan *et al.*, 2004). Ein reduzierter ATP-Gehalt führt damit zu einer Erhöhung von l-Mgm1 gegenüber s-Mgm1, wodurch die Fusion gestört wird. Das weist darauf hin, dass die Fusionskompetenz von Mitochondrien von ihrer Funktionalität abhängt. Mgm1 hat ein Säugerhomolog, OPA1, welches ebenfalls in verschiedenen Isoformen vorkommt, sich jedoch hinsichtlich der Prozessierung und des Funktionsmechanismus von Mgm1

unterscheidet. Von OPA1 existieren mehrere Spleißvarianten der langen Isoform, welche für mitochondriale Fusion essenziell sind (Duvezin-Caubet et al., 2006). Durch proteolytische Prozessierung dieser langen OPA1-Isoformen zu kurzen Isoformen wird die Fusion inhibiert und es kommt zur Fragmentierung. Dies wird beispielsweise durch die Depletion des Membranpotentials ausgelöst. Entsprechend hängt auch in Säugerzellen die Fusionskompetenz von der energetischen Bilanz der Mitochondrien ab. Das dritte notwendige Protein für mitochondriale Teilung in der Bäckerhefe, Ugo1, ist wie Fzo1 ein Protein der Außenmembran mit mehreren Transmembrandomänen, dessen N-Terminus im Zytoplasma und C-Terminus im Intermembranraum lokalisiert ist. Durch diese räumliche Orientierung kann es sowohl mit Fzo1 als auch mit Mgm1 interagieren (Sesaki und Jensen, 2001; Sesaki und Jensen, 2004; Coonrod *et al.*, 2007). Ugo1 bildet einen Komplex mit Fzo1 und Mgm1, welcher beide Membranen durchspannt und vermutlich die Fusion der Innen- und Außenmembranen koordiniert (Abbildung 3). Bisher wurde kein Homolog für Ugo1 in Säugern identifiziert.

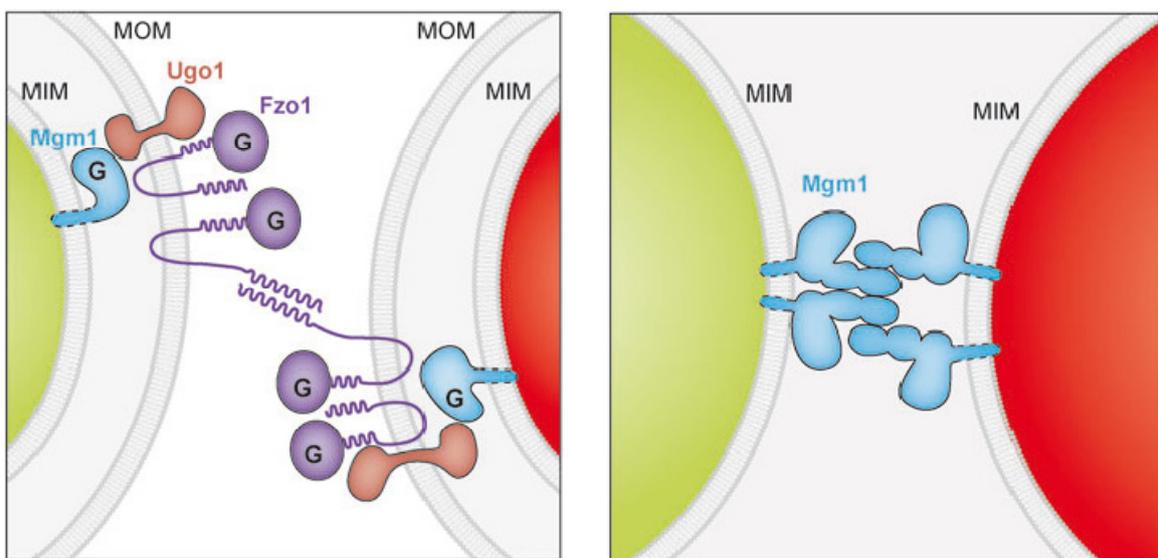


Abbildung 3: Modell der Assemblierung der mitochondrialen Fusionsmaschinerie. Die Fusion von Mitochondrien erfolgt zunächst über die Fusion der Außenmembranen (links) und anschließend über die Innenmembranfusion (rechts). Die beteiligten GTPasen (G) steuern über Homooligomerisierung die Annäherung der Membranen. MOM – mitochondriale Außenmembran, MIM – mitochondriale Innenmembran (Hoppins et al., 2007).

1.2.2 Der Mechanismus der mitochondrialen Teilung

Die Teilung von Mitochondrien verläuft im Gegensatz zur Fusion in einem Schritt und erfolgt vermutlich ähnlich dem gängigen Mechanismus der Dynamin-vermittelten

Abschnürung von Vesikeln während der Endozytose. In Bäckerhefe ist das für die mitochondriale Teilung notwendige Dynamin-ähnliche Protein mit Dnm1 bezeichnet. Dnm1 verteilt sich dynamisch zwischen dem Zytoplasma und der Oberfläche von Mitochondrien (Otsuga et al., 1998). Dabei ist die Assoziation mit Mitochondrien nicht gleichmäßig, sondern punktuell konzentriert. Die Struktur des Proteins weist neben der konservierten GTPase-Domäne noch die Mittel-Domäne und die GTPase-Effektor-Domäne (GED) auf, welche die für die Selbstassemblierung notwendigen Coiled-coil Strukturen ausbilden kann (Sever et al., 1999; Smirnova et al., 1999; van der Bliek, 1999; Hinshaw, 2000). Die mitochondriale Teilung wird durch die Assemblierung von Dnm1 in einer helikal-ringförmigen Struktur um die mitochondrialen Tubuli induziert. Diese Assemblierung wird durch gebundenes GTP stimuliert und resultiert in der Einschnürung der Tubuli (Abbildung 4) (Lackner und Nunnari, 2009). Durch die Selbstassemblierung von Dnm1 wird außerdem die Hydrolyse von GTP stimuliert, was vermutlich zu weiteren Konformationsänderungen des assemblierten Dnm1 führt und schließlich die Abschnürung der Membranen voneinander vervollständigt.

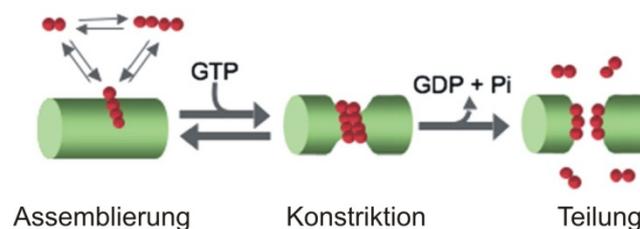


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise von Dnm1 bei der mitochondrialen Teilung: Dnm1 (rot) assembliert an Mitochondrien in einer helikalen Struktur, wodurch es zur Einschnürung der Mitochondrien kommt (Konstriktion). Die GTP-Hydrolyse vervollständigt die Teilung (Lackner und Nunnari, 2009).

In der Bäckerhefe existieren neben Dnm1 noch zwei weitere essenzielle Faktoren für die Teilung von Mitochondrien: Fis1 und Mdv1 (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Beide sind für die Assemblierung von Dnm1 am Ort der Teilung von Mitochondrien verantwortlich. Fis1 ist mit einer Transmembrandomäne am C-Terminus in der mitochondrialen Außenmembran verankert. Der N-Terminus weist eine super-helikale Tetratricopeptid-Struktur (TPR) auf (Suzuki et al., 2003; Dohm et al., 2004; Suzuki et al., 2005). Mdv1 ist peripher mit Mitochondrien assoziiert und enthält mehrere Assemblierungsmotive (Tieu und Nunnari, 2000; Cervený und Jensen, 2003). Zwei α -

Helices am N-Terminus von Mdv1 interagieren mit der TPR-Domäne von Fis1, wodurch die Assoziation mit der Außenmembran stabilisiert wird. Die coiled-coil Struktur im mittleren Bereich von Mdv1 dient der Selbstassemblierung und die WD40-Domäne, eine konservierte Peptidstruktur in Form eines Propellers, vermittelt die Interaktion mit Dnm1 (Abbildung 5). In Säugern wurden bisher nur für Dnm1 und Fis1 Homologe identifiziert: DRP1 und hFIS1. Entsprechend ist der Mechanismus der DRP1-Rekrutierung in Säugern noch weitreichend ungeklärt.

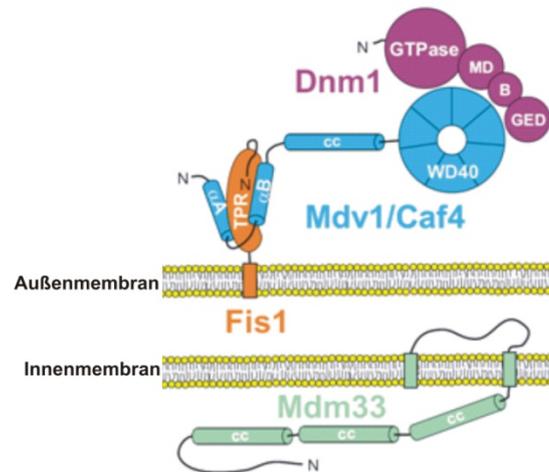


Abbildung 5: Modell der Assemblierung der mitochondrialer Teilungsmaschinerie. Dnm1 wird über Mdv1 und Caf4 an die mitochondrialen Außenmembran rekrutiert. Über Fis1 ist der Komplex in der Außenmembran verankert. Mdm33 wird als Faktor für die Teilung der Innenmembran diskutiert (Westermann, 2009).

Fluoreszenzmikroskopische Studien ergaben, dass nicht in allen Bereichen, in denen Dnm1 mit Mitochondrien assoziiert ist, unmittelbar eine Teilung stattfindet (Schauss et al., 2006). Inwieweit der Impuls zur Teilung durch Fis1 und Mdv1 gesteuert ist, konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Ebenfalls unklar ist die Funktion der Dnm1-Cluster, die nicht an der Teilung beteiligt sind. Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese Dnm1-Cluster die Mitochondrien an die Zell-Peripherie anlagern (Otsuga et al., 1998; Schauss et al., 2006). In Bäckerhefe wurde des Weiteren ein Paralog zu Mdv1, Caf4, identifiziert, das eine nahezu identische Struktur aufweist und in Abwesenheit von Mdv1 ausreichend für die Rekrutierung von Dnm1 an Mitochondrien ist (Griffin et al., 2005). Jedoch scheint Caf4 keine direkte Funktion in der mitochondrialen Teilung zu besitzen, da $\Delta caf4$ eine normale mitochondriale Morphologie aufweist. Es wurde jedoch beobachtet, dass Caf4 die

Assemblierung von Dnm1 an Mitochondrien stärker beeinflusst als Mdv1 (Schauss et al., 2006). Das könnte auf verschiedene, teilweise redundante Rollen von Caf4 und Mdv1 in der mitochondrialen Teilung hindeuten. Caf4 könnte noch eine weitere Funktion besitzen, da es die Art und Orientierung der Dnm1-Cluster beeinflusst, die nicht unmittelbar an der Teilung beteiligt sind (Schauss et al., 2006).

1.3 Die Vakuole

In Pflanzen und Pilzen wird das lysosomale Kompartiment als Vakuole bezeichnet. Die Vakuole ist von einer Membran umschlossen und besitzt wie das Lysosom tierischer Zellen eine Reihe von Hydrolasen, welche nur im sauren pH-Bereich aktiv sind. Der saure pH-Wert wird über eine Protonenpumpe unter Verbrauch von ATP aufrechterhalten. Die Vakuole ermöglicht die Speicherung von Nährstoffen, den Abbau von zelleigenem Material, reguliert die Zellgröße und erhält den Turgor. Wie die Mitochondrien weist auch die Vakuole eine dynamische Morphologie auf, die auf verschiedene intra- und extrazelluläre Reize reagiert (Li und Kane, 2009). In exponentiell wachsenden Zellen der Bäckerhefe sind mehrere Vakuolen mittlerer Größe vorhanden. Bei Eintritt in die stationäre Phase fusionieren die Vakuolen zu einem großen Kompartiment. Für diese Art von Fusion sind SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor proteins) und der HOPS-Komplex (homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting) notwendig (Wickner, 2002). Unter Stressbedingungen, zum Beispiel bei osmotischem Stress oder Stickstoffentzug, kommt es zur Fragmentierung der Vakuole in mehrere kleinere Vesikel. Im Gegensatz zur Teilung von Mitochondrien ist der Mechanismus der Teilung von Vakuolen jedoch noch vollkommen ungeklärt. Die Dynamik der vakuolären Morphologie ermöglicht die Anpassung an variierende Anforderungen, welche aus Aufnahme und Abgabe von Material aus Transport-Vesikeln verschiedenster Stoffwechselforgänge resultieren. Diese Stoffwechselforgänge und die entsprechenden Transportwege sind sowohl biosynthetischer als auch degradierender Natur (Bryant und Stevens, 1998). Zu den biosynthetischen Transportwegen gehören der alkalische Phosphatase (ALP)-Weg, der Carboxypeptidase Y (CPY)-Weg und der Cvt-Weg (*cytoplasm to vacuole-targeting*). Jeder dieser Transportwege dient dazu, vakuoläre Hydrolasen und Peptidasen in die Vakuole zu sortieren. Proteine, die über das ER in die Vakuole sortiert werden, weisen eine typische Signalsequenz auf. Dabei werden diese

Proteine als Zymogene synthetisiert und erst in der Vakuole durch Proteinase A, dem Genprodukt von PEP4, mittels proteolytische Spaltung aktiviert. Beim ALP-Weg werden lösliche, am rauen ER synthetisierte Proteine, wie zum Beispiel die namensgebende alkalische Phosphatase Pho8, in Clathrin-beschichteten Vesikeln über den Golgi-Apparat zur Vakuole transportiert und nach Fusion der Vesikel mit der Vakuole in deren Lumen freigesetzt (Cowles et al., 1997; Piper et al., 1997; Stepp et al., 1997). Der CPY-Weg ist durch den Transport der Proteine vom differenzierten Golgi-Apparat über MVB-Vesikel (*multivesikular bodies*) charakterisiert (Piper et al., 1995). Eine Sonderform ist der Cvt-Weg, der den gleichen Mechanismus nutzt wie der degradierende Transportweg der Autophagie (Harding et al., 1996). Die Autophagie ist unter 1.5 näher erläutert. Der zweite degradierende Transportweg ist die Endozytose (Piper et al., 1995). Sie dient der Aufnahme von an die Plasmamembran gebundenem und extrazellulärem Material und transportiert Nährstoffe, aber auch Giftstoffe und Abbauprodukte zur Entgiftung in die Vakuole. Dieser Transport erfolgt über Endosomen, die ebenfalls zu MVB-Vesikeln differenzieren.

1.4 Die generelle Stressantwort

Organismen werden im Laufe der Zeit diversen Stressbedingungen ausgesetzt. Um diese Bedingungen zu überdauern, haben eukaryotische Zellen spezifische Mechanismen entwickelt, um sich vor Schäden zu schützen. Die spezifischen Stressantworten können unter anderem über Signaltransduktion und Regulation der Transkription erfolgen. Neben diesen spezifischen Mechanismen, die auf den jeweiligen Stressfaktor reagieren, gibt es auch eine unspezifische oder generelle Stressantwort. Die generelle Stressantwort zielt darauf ab, bereits entstandene Schäden zu reparieren und die Zelle gegen eine weitere Schädigung durch dieselben und andere schädliche Einflüsse zu schützen. Unter Nährstoffmangel wird so z.B. auch der Schutz gegen hohe Temperaturen und osmotischen Stress aktiviert. In Bäckerhefe erfolgt diese Aktivierung hauptsächlich über die Regulation der Transkription von Genen, deren Produkte am Reparaturprozess beteiligt sind, bzw. den Metabolismus auf die Stressbedingungen einstellen, z.B. Hitzeschockproteine, Katalasen, Enzyme des Kohlenstoffmetabolismus, Transportproteine und Proteasen. Die Transkriptionsregulation der Stress-induzierten Gene verläuft dabei über einen bestimmten Bereich im Promotor, durch den die Transkription unter Stressbedingungen aktiviert wird.

Dieser Bereich, genannt STRE (*stress responsive element*), enthält die Sequenz AGGGG und findet sich im Promotor von 186 Genen in unterschiedlicher Kopiezahl (Estruch, 2000). Jedoch zeigen STRE-regulierte Gene kein einheitliches Expressionsprofil. Die Expression wird demnach zusätzlich durch andere Faktoren und möglicherweise die Anzahl an STRE-Kopien reguliert (Kobayashi und McEntee, 1993). Zum Beispiel weisen Gene, die Hitzeschockproteine kodieren, im Promotor einen zusätzlichen HSE-Bereich (*heat shock element*) auf, der additiv oder redundant mit dem STRE-Bereich die Transkription reguliert (Treger 1998). Desweiteren wird die Transkription von einigen STRE-regulierten Genen nur durch spezifische Einflüsse aktiviert (Marchler et al., 1993; Martinez-Pastor et al., 1996). Die Transkriptionsfaktoren für STRE-regulierte Gene sind die Zinkfingerproteine Msn2 und Msn4 (Martinez-Pastor et al., 1996). Während *MSN2* konstitutiv exprimiert wird, wird die *MSN4*-Expression unter Stressbedingungen durch Msn2 und durch Msn4 selbst erhöht. Msn2 und Msn4 sind teilweise funktionell redundant, wobei die Deletion von *MSN2* einen stärkeren Effekt auf die Transkription einiger STRE-regulierter Gene zeigt (Estruch und Carlson, 1993; Treger et al., 1998). Möglicherweise variiert die Aktivität von Msn2 und Msn4 abhängig von der jeweiligen Stressbedingung (Estruch, 2000). Msn2 und Msn4 sind konstitutiv aktiv; ihre Transkriptionsaktivität wird über die zelluläre Lokalisation reguliert. Bei stressfreien Bedingungen sind Msn2 und Msn4 im Zytosol an Bmh2 gebunden (Beck und Hall, 1999). Bei Stressbedingungen wird die TOR1-Kinase (*target of rapamycin*) inaktiviert, Msn2 und Msn4 werden von Bmh2 im Zytosol freigesetzt und in den Zellkern transloziert. Der Export von Msn2 und Msn4 aus dem Nukleus zurück in das Zytoplasma erfolgt über Msn5. Die Lokalisation von Msn2 und Msn4 wird desweiteren über Phosphorylierung reguliert. Es ist jedoch unklar, welche Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt sind und wie genau das Phosphorylierungsprofil die Lokalisation von Msn2 und Msn4 beeinflusst.

1.5 Autophagie

Die Autophagie ist ein spezifischer Mechanismus der Stressantwort eukaryotischer Zellen auf eine Erschöpfung der verfügbaren Nährstoffe. Der Begriff Autophagie, auch Autophagozytose, stammt aus dem Griechischen und bedeutet im übertragenen Sinn, Verdau von körpereigenem Material. Dabei wird zelleigenes Material im Lysosom oder der Vakuole abgebaut, sowohl um langlebige Proteine und Zellorganellen zu recyceln, als auch

um Nährstoffe bei ungenügender extrazellulärer Versorgung zu gewinnen (Levine und Klionsky, 2004). Autophagie ist in allen Eukaryoten evolutionär konserviert und ihre physiologische Bedeutung wurde in den letzten Jahren mehr und mehr erkannt. Defekte der Autophagie wurden mit Tumorentstehung und neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer, Parkinson und Huntington in Verbindung gebracht (Levine und Kroemer, 2008). Auch für die Funktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems spielt Autophagie eine wichtige Rolle bei der Eliminierung invasiver Pathogene (Levine und Deretic, 2007).

Autophagie wird hauptsächlich über den TOR-Komplex reguliert und wird neben Nährstoffmangel auch durch oxidativen Stress und Hitze induziert (Carrera, 2004). Es wurde jedoch auch für andere Signalwege der Zellen, z.B. für den Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg, ein Einfluss auf Autophagie beschrieben (Budovskaya et al., 2004; Schmelzle et al., 2004; Stephan et al., 2010). Mechanistisch lässt sich Autophagie in Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie einteilen (Yang und Klionsky, 2007). Während Makro- und Mikroautophagie durch dynamische Membran-Umstrukturierungen charakterisiert sind, um zelleigenes Material zu umschließen und in die Vakuole zu transportieren, erfolgt die Chaperon-vermittelte Autophagie direkt über Translokation von ungefalteten löslichen Proteinen durch die Membran der Vakuole. Desweiteren lässt sich Autophagie in nicht-selektive und selektive Formen unterteilen, wobei die selektive Autophagie durch die spezifische Sequestrierung von bestimmten Proteinen oder Organellen charakterisiert ist. In Bäckerhefe wurden bisher über 30 Autophagie (Atg)-Gene identifiziert, deren Produkte am Prozess der Autophagie beteiligt sind. Davon ist der Hauptteil für die Makroautophagie essenziell. Einige Gene sind jedoch nur für selektive Arten von Autophagie notwendig.

1.5.1 Der TOR-Kinase-Komplex und Rapamycin

Der TOR-Kinase-Komplex (TORC) wurde ursprünglich durch das Fungizid Rapamycin identifiziert. Rapamycin, auch bekannt als Sirolimus, wurde aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert, einem Bakterium, welches erstmals im Boden der Insel Rapa Nui (Osterinsel) gefunden wurde (Abbildung 6). Es ist ein lipophiles Makrolid, welches mit der Prolin-Isomerase FKBP12 einen toxischen Komplex bildet und in dieser Form die TOR-

Kinase über einen noch unbekanntem Mechanismus inhibiert (De Virgilio und Loewith, 2006). In der Medizin findet es als Immunsuppressivum Verwendung. Neuere Erkenntnisse erwiesen Rapamycin-sensitive und nicht sensitive Funktionen von TOR. Entsprechend wurden in Bäckerhefe und Säugern sowohl zwei Tor-Proteine, Tor1 und Tor2, als auch zwei TOR-Komplexe, TORC1 und TORC2 mit verschiedenen Funktionen identifiziert (Jacinto und Lorberg, 2008). Während Tor1 durch Tor2 funktionell im TORC1-Komplex ersetzt werden kann, ist Tor2 essenziell. In Bäckerhefe besteht TORC2 neben Tor2 aus Avo1, Avo3 (Rictor) und Lst8 und ist für ein funktionelles Aktin-Zytoskelett sowie für die Zellpolarität notwendig (Loewith et al., 2002; Sarbassov et al., 2004; Inoki et al., 2005). Autophagie wird ausschließlich durch den Rapamycin-sensitiven TORC1-Komplex reguliert. Im Zellzyklus stellt er die Schaltstelle zwischen Zellproliferation und stationärer Phase dar. Während des Wachstums reguliert TORC1 die Proteinsynthese auf verschiedenen Ebenen, vor allem über die Biogenese von Ribosomen. Weiterhin reguliert er die Lokalisation stress-regulierter Transkriptionsfaktoren, z.B. Gln3, Rtg3 und Msn2/4 im Zytoplasma. Die Inhibierung von TORC1 führt zur Dephosphorylierung von mehreren Effektorproteinen, darunter Atg13 und Tap42, wodurch Autophagie ausgelöst wird (Noda und Ohsumi, 1998; Kamada *et al.*, 2000; Loewith et al., 2002). Neben der direkten Inhibierung von TORC1 durch Rapamycin erfolgt die Inhibierung ebenfalls durch Stickstoff-Entzug. Jedoch sind die Signalwege, die zur TORC1-Inhibierung durch Stickstoffentzug führen, bisher kaum erforscht.

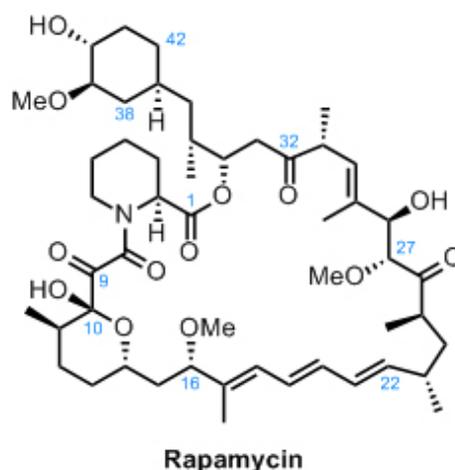


Abbildung 6: Struktur von Rapamycin

1.5.2 Makroautophagie

Der Mechanismus der Makroautophagie ist in Bäckerhefe bereits gut charakterisiert und wird oft dem Begriff Autophagie gleichgesetzt. Mechanistisch zeichnet sich Autophagie durch die Bildung von Autophagosomen aus. Dabei handelt es sich um *de novo* geformte Doppelmembranvesikel, welche zelluläres Material umschließen. Makroautophagie erfolgt in mehrere Schritten (Abbildung 7): Induktion, Bildung, Expansion, Komplettierung, Fusion und Abbau des Autophagosoms (Yang und Klionsky, 2009).

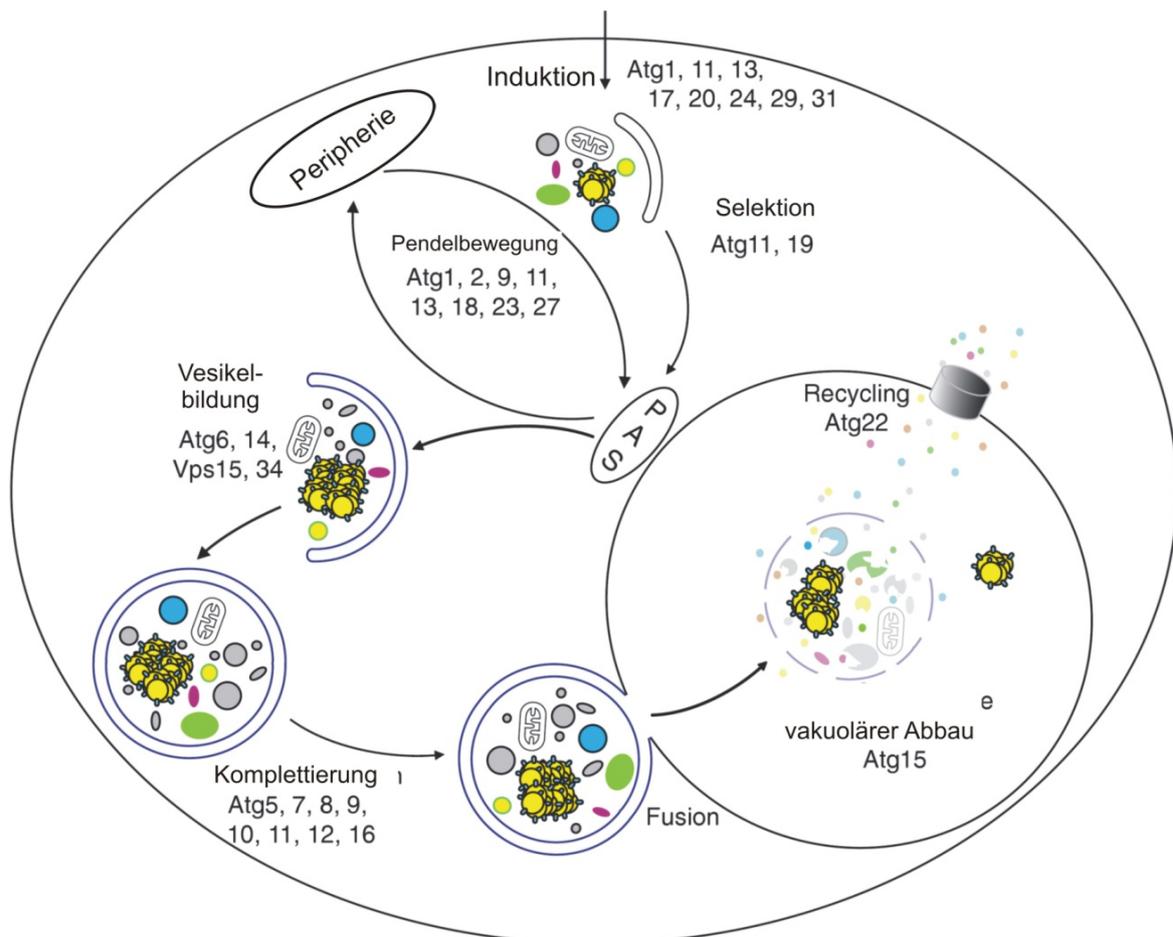


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Makroautophagie in *Saccharomyces cerevisiae*: Makroautophagie erfolgt in den Schritten Induktion, Vesikelbildung, Expansion (nicht gezeigt), Komplettierung, Fusion und Abbau des Autophagosoms. Für jeden Schritt sind die beteiligten Faktoren gekennzeichnet. Die Selektion ist nur für selektive Formen von Autophagie notwendig. PAS – Phagophore-Assemblierungsstelle (Yang und Klionsky, 2009).

Die Induktion von Makroautophagie durch TORC1-Inhibierung erfolgt in der Bäckerhefe direkt oder indirekt über Dephosphorylierung von Atg13 (Kamada et al., 2000; Kabeya et

al., 2005). Atg13 besitzt in seiner dephosphorylierten Form eine höhere Affinität zu Atg1 und Atg17, wodurch sich der Atg1-Kinasekomplex bildet (Abbildung 8). Dieser Komplex führt zur Aktivierung der Atg1-Kinase und der Rekrutierung von mehreren Atg-Proteinen zum Ort der Assemblierung des Autophagosoms (PAS – *phagophore assembly site*) (Suzuki et al., 2001; Kim et al., 2002).

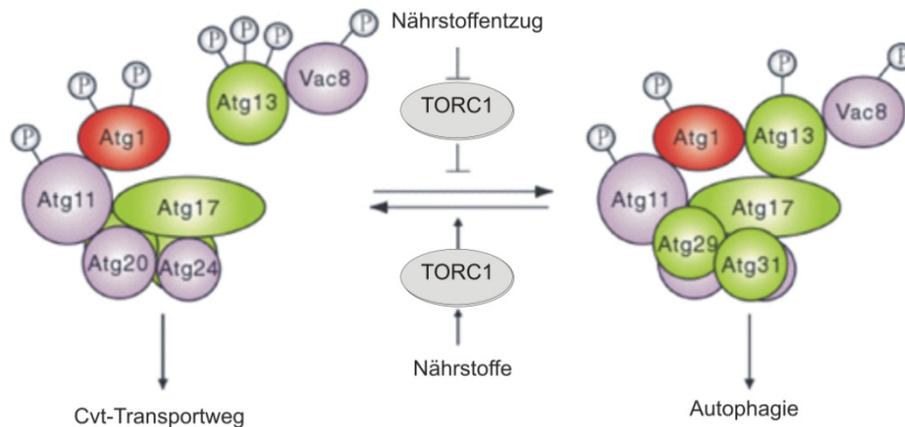


Abbildung 8: Induktion der Autophagie über den Atg1-Atg13-Atg17-Komplex. Durch Inhibierung von TORC1 wird Atg13 dephosphoryliert, wodurch die Affinität zu Atg17 steigt. Die Assemblierung des Komplexes führt zur Aktivierung von Atg1, in Folge dessen Autophagie induziert wird (Yang und Klionsky, 2009).

Die Herkunft der Membranen des späteren Autophagosoms ist dabei noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise werden Membranen durch die Pendelbewegung von Atg9 zwischen den Mitochondrien und der PAS herantransportiert (Noda et al., 2000; He et al., 2006). Tatsächlich deuten neueste Erkenntnisse in Säugerzellen darauf hin, dass die Membranen von Mitochondrien stammen könnten (Hailey et al., 2010). Es werden jedoch auch das endoplasmatische Retikulum und der Golgi Apparat als mögliche Quellen, sowie die völlige Neubildung von Membranen diskutiert. Weiterhin wichtig für die Initiierung der Vesikelbildung ist der Phosphatidylinositol- (PtdIns) 3-Kinase-Komplex I, welcher die PtdIns-3-Kinase Vps34 sowie Vps15, Vps30 (Atg6) und Atg14 enthält (Stack et al., 1995; Kihara et al., 2001). Eine mögliche Funktion dieses Komplexes könnte die Produktion von Phosphatidylinositol-3-phosphat sein, welches die Rekrutierung weiterer Atg-Proteine und deren Bindung an die PAS fördert (Yang und Klionsky, 2009). Im nächsten Schritt erfolgt die Vergrößerung und Fertigstellung des Autophagosoms, wofür zwei Protein-Konjugationssysteme benötigt werden: Atg12-Atg5 und Atg8 (Abbildung 9) (Kim et al.,

2002). Atg12 ist mit Atg5 kovalent über eine Isopeptidbindung verknüpft. Diese Verknüpfung wird über Atg7 und Atg10 gebildet. Weiterhin ist Atg5 nicht-kovalent mit Atg16 verknüpft, dessen Homooligomerisierung zu einem multimeren Atg12-Atg5-Atg16 Komplex führt (Kuma et al., 2002). Dieser Komplex lagert sich hauptsächlich an der Außenseite der expandierenden Vesikelvorstufe an und ist für die Rekrutierung von Atg8 notwendig. Atg8 ist an Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert (Ichimura et al., 2000). Diese Konjugation erfolgt am C-terminalen Glycin durch Atg7 und Atg3, nachdem das C-terminale Arg117 des neu synthetisierten Atg8 durch Atg4 abgespalten wurde (Kirisako et al., 2000). Atg8-PE ist ein integrales Membranprotein und lagert sich sowohl in die innere als auch in die äußere Membran des Autophagosoms ein. Sowohl das Atg12- als auch das Atg8-Konjugationssystem könnten als äußere Hülle fungieren, welche die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole vor Fertigstellung verhindert. Entsprechend dissoziieren beide Konjugationssysteme mit den meisten anderen Atg-Proteinen vor der Fusion mit der Vakuole wieder vom Autophagosom.

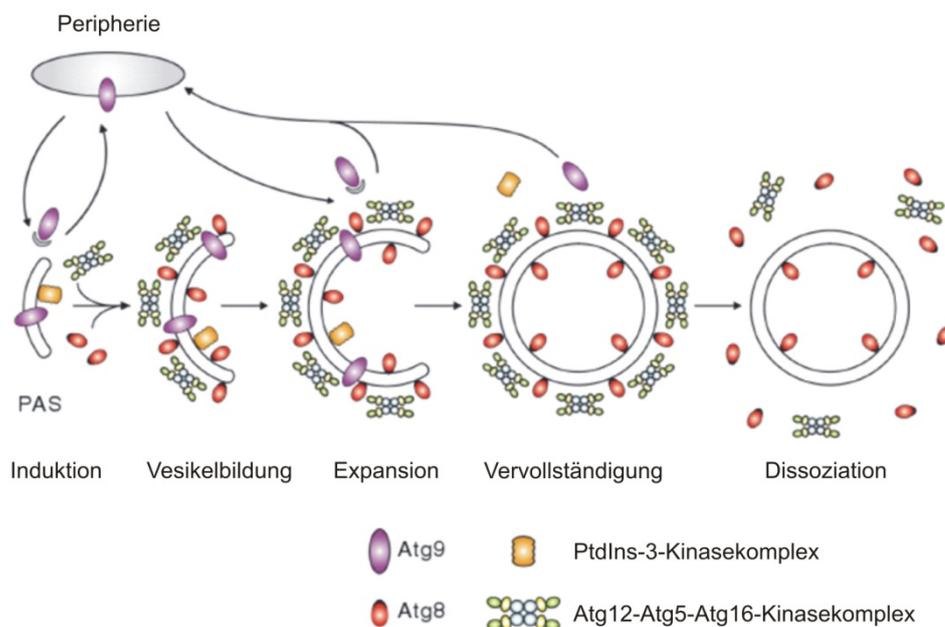


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bildung des Autophagosoms. Am Ort der Assemblierung (PAS) wird zunächst Atg9 und der PtdIns-3-Kinase-Komplex rekrutiert. Die Konjugationssysteme Atg8 und Atg12-Atg5-Atg16 vermitteln die Expansion des Autophagosoms. Nachdem das Autophagosom vollständig ausgebildet ist, erfolgt die Dissoziation der meisten Proteine vom Vesikel (Yang und Klionsky, 2009).

Die Fusion erfolgt über Proteine, die auch die homotypische Vakuolenfusion steuern (Abbildung 10) (Wang und Klionsky, 2003). Dabei wird die Außenmembran des Autophagosoms in die Vakuolenmembran integriert.

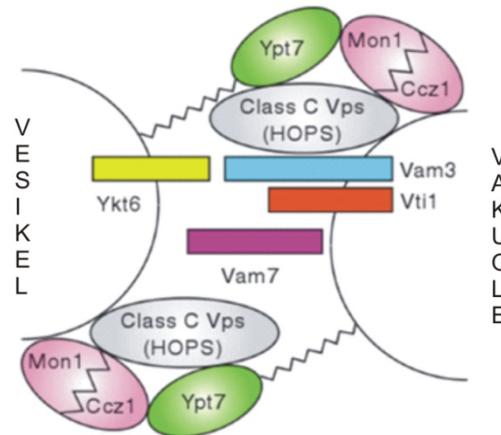


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Fusion eines Autophagosoms mit der Vakuole. Mon1 und Ccz1 bilden einen Komplex, welcher das Ypt7-abhängige Andocken der Membranen vermittelt. Dadurch kann der SNARE-Komplex aus den Proteinen Vam3, Vam7, Ykt6 und Vti1 assemblieren. Der HOPS-Komplex wird zusammen mit Ypt7 ebenfalls zum Andocken der Membranen benötigt (Yang und Klionsky, 2009).

Ein Großteil der Proteine dieser Außenmembran wird wieder zu einer PAS recycelt. Das Autophagosom gelangt als Einfach-Membran-Vesikel ins Lumen der Vakuole, wo es durch Hydrolasen abgebaut wird. Atg8-PE, welches in der Innenmembran eingelagert war, wird somit ebenfalls in der Vakuole freigesetzt. Essenziell für den Abbau sind der saure pH-Wert der Vakuole und die vakuolären Hydrolasen, z.B. Pep4 und Prb1. Wie die so gewonnenen Makromoleküle für den Aufbau essenzieller Zellbestandteile aus der Vakuole rekrutiert werden, ist jedoch bis heute wenig bekannt (Yang und Klionsky, 2009).

1.5.3 Mikroautophagie

Der Begriff Mikroautophagie bezeichnet den direkten Einschluss von Zytoplasma und Organellen über eine Einstülpung der Vakuolenmembran. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die Atg-Proteine auch für diesen Prozess notwendig sind. Jedoch scheint die Induktion von Makroautophagie die Grundvoraussetzung für Mikroautophagie von zytosolischem Material zu sein (Sattler und Mayer, 2000). Die vakuoläre Membran, die durch die

Einstülpung ins Lumen der Vakuole gelangt, wird abgebaut. Damit könnte Mikroautophagie die Entstehung von exzessivem vakuolärem Membranmaterial, welches durch die Fusion mit Autophagosomen entsteht, kompensieren (Uttenweiler et al., 2007). Einige Organellen können ohne Induktion von Makroautophagie über Mikroautophagie abgebaut werden. Dazu gehört der Zellkern, welcher teilweise durch die Vakuole eingeschnürt und abgebaut wird. Diesen Prozess bezeichnet man als „*Piecemeal Microautophagy of the Nucleus*“ (PMN) (Pan et al., 2000; Kvam und Goldfarb, 2004; Kvam et al., 2005). Desweiteren werden Peroxisomen in Abhängigkeit von Nährstoffbedingungen und Stammhintergrund über Mikroautophagie abgebaut (Veenhuis et al., 1983; Tuttle et al., 1993; Gunkel et al., 1999; Hutchins und Klionsky, 2001; Sakai et al., 2006).

1.5.4 Selektive Formen von Autophagie

Die selektive Autophagie zeichnet sich dadurch aus, dass bestimmtes Material, z.B. ein Organell oder Protein, gezielt in Autophagosomen verpackt wird bzw. durch die Vakuole eingeschlossen wird, um es in der Vakuole abzubauen (Yang und Klionsky, 2009). Die so gebildeten Autophagosomen enthalten in der Regel kein zusätzliches unspezifisches Material, wie zum Beispiel Zytoplasma. Einige Faktoren sind nur für selektive Formen von Autophagie essenziell. Dazu zählen Atg11, Atg20 und Atg24 (Nice et al., 2002; Yorimitsu und Klionsky, 2005). Desweiteren wird selektive Autophagie über Arp2 und Atg9 durch das Aktin-Zytoskelett beeinflusst (Reggiori et al., 2005; Monastyrska et al., 2008). Möglicherweise verhindert die Depolarisierung des Aktin-Zytoskeletts den Transport von selektivem Material zur PAS. Die selektive Autophagie von Organellen kann über Mikroautophagie und Makroautophagie erfolgen. Im Gegensatz zu allen anderen Organellen werden Teile des Zellkerns jedoch nur über Mikroautophagie abgebaut, wie unter Punkt 1.5.3 beschrieben. Nachfolgend werden einige Beispiele für selektive Autophagie näher erläutert.

1.5.4.1 Der Cvt-Weg

Der Cvt-Weg ist eine Sonderform der selektiven Autophagie, welcher bisher nur in Bäckerhefe charakterisiert wurde. Er findet unter proliferierenden Bedingungen statt und dient der Sortierung von zwei Proteinen, Aminopeptidase 1 (Ape1) und Alpha-

Mannosidase 1 (Ams1), zu ihrem Funktionsort, der Vakuole (Klionsky 1992, Shintani 2002). Der Mechanismus ist größtenteils mit dem der Makroautophagie identisch, wobei das gebildete Vesikel mit Cvt-Vesikel bezeichnet ist und eine deutlich geringere Größe aufweist als ein Autophagosom. Damit sind viele Atg-Proteine sowohl für Makroautophagie als auch für den Cvt-Weg essenziell. Es gibt jedoch einige spezifische Faktoren für den Cvt-Weg, welche hauptsächlich an der Erkennung und Bindung der zu transportierenden Proteine an die PAS beteiligt sind (Abbildung 7). Für Ape1 ist dieser Mechanismus gut untersucht. Ape1 wird als Vorstufe synthetisiert und assembliert zu einem Dodecamer (Kim et al., 1997; Klionsky, 1997). Diese Dodecamere werden weiter oligomerisiert und bilden schließlich den Ape1-Komplex (Shintani et al., 2002). Das Ape1-Propeptid, welches eine vakuoläre Signalsequenz darstellt, interagiert mit Atg19 und bildet den Cvt-Komplex (Scott et al., 2001). Dieser Komplex wird von einer Doppelmembran umschlossen und bildet das Cvt-Vesikel. Für diesen Schritt ist Atg11 entscheidend. Es interagiert mit Atg19 und agiert als Rezeptor, welcher den Cvt-Komplex zum Ort der Vesikelbildung, der PAS, leitet (Yorimitsu und Klionsky, 2005). Atg11 ist damit für alle Formen der selektiven Autophagie essenziell. Zusätzlich wurden zwei weitere Proteine identifiziert, Atg20 und Atg24, die für den Cvt-Transportweg, jedoch nicht für Makroautophagie notwendig sind. Beide Proteine besitzen eine PX-Domäne (*phagocytic oxidase*), welche an PtdIns-3-P an der PAS bindet. Sie sind für die Rekrutierung von Membranen zur PAS notwendig (Nice et al., 2002). Atg20 interagiert zusätzlich mit Atg11. Damit könnten Atg20 und Atg24 auch Teil des Atg1-Kinasekomplexes sein (Abbildung 8). Bei Induktion von Autophagie wird der Cvt-Weg durch Makroautophagie ersetzt, wobei der Cvt-Komplex in Autophagosomen eingeschlossen und in die Vakuole transportiert wird (Baba et al., 1997). Dabei sind die Selektion und effektive Rekrutierung von Ape1 und Ams1 immer noch abhängig von Atg19 und Atg11.

1.5.4.2 Pexophagie

Ein Beispiel für selektive Autophagie eines Organells ist Pexophagie. Sie dient dazu, die Zahl an Peroxisomen der jeweiligen Kohlenstoffquelle anzupassen (Veenhuis et al., 1983; Tuttle et al., 1993). In Hefen werden Peroxisomen hauptsächlich für die Metabolisierung von Ölsäure oder Methanol benötigt. Daher wird ihre Proliferation durch diese Kohlenstoffquellen begünstigt. Werden diese Kohlenstoffquellen ersetzt, benötigt der

Organismus folglich keine Peroxisomen für die Metabolisierung mehr und es kommt zu einem selektiven Abbau der Peroxisomen in der Vakuole. Der Mechanismus der Pexophagie unterscheidet sich stark in verschiedenen Organismen und ist außerdem von der Kohlenstoffquelle abhängig, was wahrscheinlich auf unterschiedliche ATP-Gehalte zurückzuführen ist (Ano et al., 2005). Makropexophagie wurde bisher vor allem in *Hansenula polymorpha* untersucht. Sie erfolgt ähnlich der Makroautophagie, wobei Peroxisomen selektiv in Vesikeln, den Pexophagosomen eingeschlossen werden. Entsprechend sind Faktoren für die Erkennung von Peroxisomen und Bindung an das PAS notwendig. Bisher wurden zwei peroxisomale Membranproteine identifiziert, Pex3 und Pex14, die dabei eine Rolle spielen (Bellu et al., 2001a; Bellu et al., 2001b; Bellu et al., 2002). Desweiteren ist Atg11 als Rezeptor auch für Pexophagie essenziell. Für alle folgenden Schritte verläuft die Makropexophagie ähnlich der Makroautophagie und dem Cvt-Weg und benötigt dieselben Faktoren.

1.5.4.3 Mitophagie

Im Zuge elektronenmikroskopischer Studien zu Makroautophagie in Bäckerhefe waren in vakuolären Vesikeln nach Stickstoffentzug auch weitere Organelle wie zum Beispiel das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien zu erkennen. Diese Beobachtung wurde zunächst darauf zurückgeführt, dass Organellen zufällig zusammen mit Zytoplasma durch Autophagosomen eingeschlossen werden. Neueste Erkenntnisse lassen jedoch darauf schließen, dass unter Stickstoffmangel auch ER und Mitochondrien selektiv abgebaut werden (Camougrand *et al.*, 2004; Hamasaki *et al.*, 2005; Kanki und Klionsky, 2008). Diese Prozesse werden entsprechend als ERphagie und Mitophagie bezeichnet. Da beide Organellen über einen hohen Proteingehalt verfügen, stellen sie eine ergiebige Stickstoffquelle dar. Desweiteren ist die Proteinbiosynthese unter Nährstoffmangel reduziert, wodurch insgesamt weniger ER notwendig ist. Eine Einschränkung des Stoffwechsels durch den Abbau von Mitochondrien kann ebenfalls von Vorteil sein. Der selektive Abbau von ER und Mitochondrien hat damit eine physiologische Bedeutung in der Anpassung der Zellen an Nährstoffmangel. Während der Mechanismus für den selektiven Abbau von ER kaum untersucht ist, wurden für Mitophagie erste Faktoren identifiziert. In Bäckerhefe hängt Mitophagie induziert durch Stickstoffmangel demnach von Atg11 und teilweise von Atg20 und Atg24 ab (Kanki und Klionsky, 2008). Das

bestätigt, dass ein selektiver Abbau ähnlich wie im Cvt-Weg stattfindet. Bisher wurden auch die Proteine Uth1 und Aup1 mit Mitophagie in Verbindung gebracht; ihre genaue Funktion ist jedoch noch unklar (Camougrand et al., 2004; Tal et al., 2007). Mitophagie wurde ebenfalls beobachtet, nachdem die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials in den Zellen verhindert wurde (Priault et al., 2005). Das Membranpotenzial wird entweder durch die Atmungskette oder während der Fermentation durch die reverse Funktion der ATPase aufrechterhalten. In einem Stamm, in dem bei erhöhter Temperatur die Assemblierung der ATPase gestört ist, wurden unter Bedingungen von 37°C und Hypoxie vermehrt mitochondriale Proteine abgebaut. Jedoch wurde gleichzeitig die Induktion von nicht selektiver Autophagie beobachtet. In einem weiteren Beispiel wurde Mitophagie nach Herunterregulation der MDM38-Expression beobachtet (Nowikovsky et al., 2007). Die Funktion dieses Proteins wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird eine Funktion für den Kalium/Protonen-Kanal und zum anderen für mitochondriale Translation diskutiert (Frazier et al., 2006; Nowikovsky et al., 2007). Depletion von Mdm38 führte zunächst zum osmotischen Schwellen von Mitochondrien und nach längerer Zeit zu einem ausgeprägten Abbau in der Vakuole. In Säugerzellen wurde Mitophagie während der Reifung von Erythrozyten beobachtet, welche keine Mitochondrien besitzen (Schweers et al., 2007; Sandoval et al., 2008; Novak et al., 2010). Dabei wurde die Depolarisierung des Membranpotenzials als Voraussetzung für die Mitophagie identifiziert. Zusätzlich ist das Protein NIX unter diesen Bedingungen für den Einschluss der Mitochondrien in Autophagosomen notwendig. Einige Studien identifizierten die Proteine PINK1 und PARKIN, welche mit der Entstehung von Parkinson assoziiert werden, in Säugerzellen als notwendig für die Sequestrierung dysfunktionaler Mitochondrien in Autophagosomen (Narendra et al., 2008; Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2010). In diesem Fall ist die Rekrutierung von PARKIN über PINK1 ebenfalls abhängig von der Depolarisierung des Membranpotenzials (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2010). Die Entstehung von Parkinson könnte damit mit dem fehlenden Abbau dysfunktioneller Mitochondrien verbunden sein. Desweiteren wurde in einem anderen Säugerzellmodell beobachtet, dass mitochondriale Teilung in Tochtermitochondrien mit unterschiedlichem Membranpotenzial resultiert (Twig et al., 2008). Kann das Membranpotenzial nicht wieder hergestellt werden, wird die Fusion mit dem mitochondrialen Netzwerk verhindert und das mitochondriale Fragment durch Autophagie abgebaut.

1.6 Zielsetzung

Bisher wurden einige neurodegenerative Erkrankungen auf eine Störung der mitochondrialen Dynamik zurückgeführt. Dazu gehört die autosomal dominante Optikusatrophie Typ1 (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000), Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A und 4A (Zuchner et al., 2004; Niemann et al., 2005) und die Parkinsonsche Erkrankung (Banerjee et al., 2009; Exner et al., 2007; Yang et al., 2008). Diese Zusammenhänge lassen darauf schließen, dass die mitochondriale Dynamik, insbesondere die Notwendigkeit der schnellen Folge von Teilungs- und Fusionsvorgängen, eine weitreichende funktionelle Bedeutung hat, über die bisher jedoch nur wenig bekannt ist. Eine bisher diskutierte Hypothese besagt, dass das Gleichgewicht aus Teilung und Fusion der Qualitätskontrolle von Mitochondrien dient (Herlan et al., 2004; Lyamzaev et al., 2004; Duvezin-Caubet et al., 2006; Kim et al., 2007; Twig et al., 2008). Demnach verlieren Mitochondrien mit eingeschränkter Funktionalität ihre Fusionskompetenz und werden vom Netzwerk isoliert. Die mitochondriale Morphologie könnte somit der Differenzierung zwischen funktionellen und geschädigten Mitochondrien innerhalb der Zelle dienen. Diese Differenzierung könnte wiederum den gezielten Abbau der dysfunktionellen Mitochondrien ermöglichen. Ein solcher Mechanismus könnte verhindern, dass sich Schäden auf das gesamte mitochondriale Netzwerk der Zelle verteilen. Weiterhin würde sichergestellt, dass nur funktionelle Mitochondrien auf Tochterzellen vererbt werden können. Die Studien zu Mitophagie in Säugern deuten auf einen Zusammenhang zur mitochondrialen Dynamik und dysfunktionellen Mitochondrien hin (Narendra et al., 2008; Twig et al., 2008). Demnach werden nicht-fusionskompetente Mitochondrien selektiv durch Mitophagie abgebaut.

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation wies erstmals die Studie von Priault *et al.* (2004) in *Saccharomyces cerevisiae* auf einen möglichen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Funktion und Mitophagie hin. Der Mechanismus der Mitophagie war jedoch einschließlich der beteiligten Faktoren noch weitgehend ungeklärt. Insbesondere der Einfluss der mitochondrialen Morphologie auf die Mitophagie war bisher nicht untersucht. Um die Hypothese zu prüfen, ob mitochondriale Dynamik dem gezielten Abbau dysfunktioneller Mitochondrien über Mitophagie dient, war es zunächst notwendig, die Mitophagie näher zu charakterisieren. Als Modellorganismus dieser Studie wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) gewählt, in dem die Mechanismen der selektiven

und nicht selektiven Autophagie zum großen Teil bereits bekannt waren. Zur Untersuchung der Mitophagie bedurfte es der Etablierung einer geeigneten quantitativen Methode. Anschließend sollten mit dieser Methode Bedingungen gefunden werden, Mitophagie zu induzieren. Dabei stellte sich die Frage, inwiefern die Induktion der Mitophagie unter diesen Bedingungen selektiv ist. Insbesondere war es von Interesse, den Einfluss der mitochondrialen Morphologie auf die Mitophagie sowie die Autophagie zu untersuchen. Dabei sollten speziell folgende Fragen adressiert werden:

1. Führt Mitophagie zur Fragmentierung von Mitochondrien?
2. Ist eine Fragmentierung der Mitochondrien ausreichend, um Mitophagie zu induzieren? Wenn ja, wird nur Mitophagie oder auch Autophagie induziert?
3. Ist die Fragmentierung von Mitochondrien eine Voraussetzung für die Induktion von Mitophagie?

Die Beantwortung dieser Fragen erlaubt näher zu beleuchten, ob die Dynamik der mitochondrialen Morphologie tatsächlich der Qualitätskontrolle von Mitochondrien dient. Zusätzlich könnte die Identifizierung von Proteinen, die für Mitophagie notwendig sind, Hinweise auf die physiologische Funktion der Mitophagie und zu ihrer Regulation liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung	Serva , Heidelberg
Agar-Agar	Serva , Heidelberg
Agarose	Serva , Heidelberg
Alexa-Fluor-Phalloidin 568	Invitrogen , Groningen
Aminosäuren	Sigma , München
Ammoniumsulfat	AppliChem , Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma , München
Ampicillin	AppliChem , Darmstadt
Amylose-Resin	New England Biolabs , Schwalbach
Bacto-Pepton	DIFCO , Detroit, USA
Bacto-Trypton	DIFCO , Detroit, USA
BCA Reagenz A	Pierce , Rockford, USA
Biomax MR Kodak TR-1 Film 13 x 18 cm	Kodak , München
Bradford Reagenz	Biorad , München
Bromphenolblau	Serva , Heidelberg
BSA Grade VIII (fettsäurefrei)	Sigma , München
Coomassie Blau G	Serva , Heidelberg
Coomassie Brillant Blau R-250	Serva , Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphat	New England Biolabs , Schwalbach
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories , Paschin, AU
ECL-Immunoblot-Detektionssystem	Amersham-Biosciences , Freiburg
Elektroporationsküvetten	Invitrogen , Groningen
Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme	Agfa-Gevaert , München
Ethanol	Serva , Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma , München
Faltenfilter	Schleicher & Schüll , Kassel
Ficoll	Sigma , München

Freund's inkompletus Adjuvant	Sigma , München
Galaktose	AppliChem , Darmstadt
Gel Drying Film	Promega , Heidelberg
Gel-Extraktionskits für DNA	PeqLab, Biotechnologie GmbH , Erlangen
Glycerol	Sigma , München
Harnstoff	Serva , Heidelberg
Hefeextrakt	DIFCO , Detroit, USA
HEPES	Serva , Heidelberg
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Serva , Heidelberg
Kaliumacetat	Riedel de Haen , Seelze
Kaninchen- Retikulozytenlysats	Amersham-Biosciences , Freiburg
Kanülen, Spritzen	Braun , Melsungen
Lachsspermien-DNS	Sigma , München
Leupeptin	Sigma , München
Luminol	Sigma , München
Lysozym	Serva , Heidelberg
Magermilchpulver	AppliChem , Darmstadt
Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG	Biorad , München
β -Mercaptoethanol	Sigma , München
Molekulargewichts-Standard für SDS-PAGE	Fermentas , St. Leon-Roth
Nanosep Cenrtifugal Devices	Pall Life Sciences , New York, USA
Oligonukleotide	Metabion , Martinsried
Pfu-DNA-Polymerase	Promega , Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt , Bad Homburg
PMSF	Sigma , München
p-Cumarinsäure	Sigma , München
p-Nitrophenylphosphat	Carl Roth GmbH , Karlsruhe
Ponceau S	Serva , Heidelberg
Proteinase K	Sigma , München
Proteinstandard	Biorad , München
Protran Nitrozellulosemembranen BA83	Schleicher & Schüll , Kassel
o-Phenanthroline	Sigma , München
pYX-Vektoren	R&D Systems , Abingdon, UK

QIAquick Gel Extraction Kit,	Qiagen , Hilden
Raffinose	Serva , Heidelberg
Rapamycin	LC Laboratories , USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt , Bad Homburg
Restriktionsenzyme und 10 x Puffer für Restriktionsenzyme	New England Biolabs , Schwalbach
Rnasin	Promega , Heidelberg
Röhrchen	Sarstedt , Bad Homburg
Saccharose (Sucrose)	Roth , Karlsruhe
SDS	Serva , Heidelberg
Serva Blau G	Serva , Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma , München
Sterilfilter	Schleicher & Schüll , Kassel
Sulfolink coupling gel	Pierce , Rockford, USA
Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm	Fuji , Tokyo, Japan
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs , Schwalbach
TEMED	Serva , Heidelberg
Titermax Gold™	Sigma , München
TRIS	AppliChem , Darmstadt
Triton X-100	Sigma , München
Wasserstoffperoxid	AppliChem , Darmstadt
Whatman Filterpapiere	Schleicher & Schüll , Kassel
Yeast Extract	Serva , Heidelberg
Yeast Nitrogen Base	Invitrogen , Groningen
Zymolyase 20T	Seikagaku , Tokyo, Japan

Alle sonstigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Geräte

Agarose-Geldokumentation	2UV Transilluminator GDS-7900, UVP Upland, USA
Autoklav	Varioclav® 400E, H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschränke	Inkubatoren Heraeus Christ, Osterode
CCD-Kamera für Fluoreszenzmikroskop	Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA
Elektroporationssystem	Gene Pulser, BioRad, München
Entwicklermaschine	Gevamatic 60®, Agfa-Gevaert, München
Feinwaagen	Sartorius, Mainz
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Halbtrocken-Blotapparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Inkubationsgeräte	
96-Well-Platteninkubator, -schüttler	BT130-1, HLC
	DTS-2, Neolab, Heidelberg
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Kolbenhubpipetten	Gilson Inc., USA
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidorph
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	ECLIPSE TE 2000-E, Nikon
Peristaltische Pumpe P-1	Amersham Biosciences, Freiburg
pH-Meter	Lab850, Schott, Zwiesel
Photometer	
Photometer (600 nm)	Ultrospec 10, Amersham Biosciences,

	Freiburg
Photometer (UV)	BioPhotometer Eppendorf
96-Well-Plattenlesegerät	Multiscan RX, ThermoScientific
	Software: Ascent 2.6
Reinstwasseranlagen	PureLab Plus, USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach
Spannungsquellen	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilbank	BDK
Thermocycler	Primus 25/96, MWG Biotech, Ebersberg
	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Branson Sonifier B-15, G. Heinemann
Vortex-Mixer	Bender und Hobein, München
Wärmeschränke	Memmert, Hannover
Zellhomogenisator	Precellys 24®, Bertin-Technologies
Zentrifugen	
Zentrifugen J2-21	Beckman Instruments
Ultrazentrifugen	Optima TLX, Optima MX-E, L8-50M/E, L8-M
Tischzentrifugen	5415D und 5810R Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	3K30, Sigma, München

2.2 Kulturmedien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid

LB-Platten: LB-Medium; 1,5% (w/v) Agar

Für LBamp-Medium sowie -Platten wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml sterilfiltriertes Ampicillin zugegeben.

YP-Medium: 1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Bacto-Pepton; mit HCl auf pH 5 eingestellt und autoklaviert

2% (w/v) Glukose (YPD), 2% (w/v) Galactose (YPGal) oder 2% (w/v) Glycerol (YPG) wurden als konzentrierte Stammlösungen nach separatem Autoklavieren zugegeben.

S-Medium: 1,7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; 2% (w/v) Galaktose (SGal), 2% (w/v) Glycerin + 0,1% Glukose (SG) oder 2% (w/v) Glukose (SD)

Auxotrophiemarker:	Adenin	20 mg/l
	Uracil	20 mg/l
	Histidin	20 mg/l
	Leucin	20 mg/l
	Lysin	20 mg/l
	Tryptophan	20 mg/l

Die Zusammensetzung des stickstofffreien S-N-Mediums entsprach der von S-Medium ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren. Für die Herstellung von Kulturplatten für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des entsprechenden Flüssigmediums 2% (w/v) Agar zugegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolierung genomischer DNA (Rose, 1990) wurde der entsprechende Hefestamm über Nacht in YPD-Medium bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden aus 10 ml Kultur durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 3000 xg sedimentiert, mit 10 ml Wasser gewaschen und in 200 µl Puffer (2% (w/v) Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1(v/v/v)) sowie ca. 100-300 mg Glaskugeln (mit 0,45 mm Durchmesser) zugegeben und die Zellen mittels Vortex für fünf Minuten aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0) wurden die Proben für fünf Minuten bei 13000 xg in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 200 µl sterilem Wasser gelöst

(siehe 2.3.10). Die in den Proben enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 75 µg/ml RNase A und Inkubation bei 37°C für fünf Minuten abgebaut. Nach erneuter Fällung mit Ethanol wurde die DNA in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen.

2.3.2 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Spezifische DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler amplifiziert (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Ein Reaktionszyklus bestand dabei aus der Trennung der Matrizenstränge, Anlagerung von kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primer) an die einzelsträngige Matrizen-DNA und der Verlängerung dieser Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt 3 U der thermostabilen DNA-Polymerase, 1,5 mM MgSO₄, 100 pmol der beiden Oligonukleotide (Primer), 200 µM der vier Desoxynukleosid-5'-triphosphate und ca. 100 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA als Matrize. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurden die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (GL BioTech) und die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) verwendet. Die Taq-Polymerase ist besonders prozessiv, jedoch auch fehleranfällig, da diese im Gegensatz zur Pfu-Polymerase keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist. Diese „proof-reading“-Aktivität verringert erheblich die Fehlerrate, jedoch bedingt diese die geringere Prozessivität der Pfu-Polymerase. Deletionskassetten wurden mit der Taq-Polymerase und Gensequenzen mit der Pfu-Polymerase amplifiziert.

Die PCR wurde mit einem 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C, bei dem die Matrizen-DNA vollständig in Einzelstränge aufgetrennt wird, begonnen. Diesem Schritt folgte ein 25-30 Zyklen umfassender Amplifizierungsschritt. Ein einzelner Zyklus bestand aus drei Schritten: 1. Denaturierung der Matrix-Stränge bei 95°C für eine Minute, 2. Anlagerung der spezifischen Primer zwischen 40°C und 60°C für eine Minute, 3. DNA-Synthese bei 72°C für ein bis drei Minuten, entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bzw. der Aktivität der verwendeten DNA-Polymerase. Nach der Amplifizierung folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C, um unvollständig synthetisierte DNA-Stränge zu vervollständigen. Zum Abschätzen der Anlagerungstemperatur der Primer an die Matrix wurde die „2+4-Regel“ (G/C = 4°C, T/A = 2°C) verwendet. Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese in Agarosegelen

elektrophoretisch getrennt (siehe 2.3.3) und entsprechend aus präparativen Agarosegelen oder über Mikrozentrifugationssäulen isoliert (siehe 2.3.4).

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben wurden zur Größenbestimmung oder Trennung in 5-fach-konzentriertem Auftragspuffer (0,05% (w/v) Bromphenolblau; 5 mM EDTA; 30% (v/v) Glycerol; pH 8,0) aufgenommen und in horizontalen Agarosegelen (1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer: 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 40 mM Tris/Acetate; pH 7,4) elektrophoretisch getrennt. Zur Detektion der DNA wurde die Agaroselösung vor dem Erkalten mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese wurde mit einer Feldstärke von 10-15 V/cm durchgeführt. Die DNA-Banden wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Anhand eines DNA-Größenstandards wurden die Größen der Fragmente und deren Konzentration abgeschätzt.

2.3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die im Agarosegel getrennten DNA-Banden wurden zunächst unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit einem Gel-Extraktionskit über Mikrozentrifugationssäulen nach Anweisung des Herstellers (E.Z.N.A. PEQLAB).

2.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller (New England Biolabs, NEB) mitgelieferten Puffer-Systemen. Es wurden ein bis zwei Units der entsprechenden Restriktionsendonukleasen pro Mikrogramm DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden zur Analyse für eine Stunde, bei präparativen Ansätzen für zwei bis vier Stunden oder über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Bei präparativen Ansätzen wurde die DNA über Mikrozentrifugationssäulen gereinigt (siehe 2.3.4).

2.3.6 Ligation von DNA

Für die Ligation wurde die Konzentration des Vektors und des zu inserierenden DNA-Fragments über ein Agarosegel abgeschätzt. Der linearisierte Vektor wurde in ungefähr dreifachem molarem Überschuss zu inserierendem DNA-Fragment eingesetzt. Im Ligationsansatz wurde der vom Hersteller der T4-DNA Ligase (New England Biolabs, NEB) mitgelieferte 5-fach Puffer verwendet (5 mM ATP; 50 mM Dithiothreitol (DTT); 50 mM MgCl₂; 25 µg/ml BSA; 250 mM Tris/HCl; pH 7,6). In einem 10 µl-Ansatz wurden 0,5 U T4-DNA Ligase verwendet. Die Ansätze wurden für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert; 1 µl des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet (siehe 2.3.8).

2.3.7 Präparation transformationskompetenter Zellen von *E. coli*

Aus einer 50 ml Übernachtskultur von *E. coli* XL1-blue wurden 2 l LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,05 angeimpft. Anschließend wurde diese Kultur bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht worden war. Die Kultur wurde 30 Minuten auf Eis gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 xg und 2°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit 1000 ml, 500 ml und schließlich mit 100 ml vorgekühlter, 10%-iger Glycerin-Lösung (v/v) gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Überstand vollständig entfernt und die Bakterien in 1 ml 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 50 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.8 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Transformationskompetente *E. coli*-Zellen wurden durch Elektroporation transformiert. Dazu wurden 50 µl kompetenter Zellen (siehe 2.3.7) mit 1 µl eines Ligationsansatzes oder einer 1:100 Verdünnung einer Midi-Plasmidpräparation (siehe 2.3.9) versetzt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporationsgerät mit einem Spannungspuls transformiert (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF; Gene-Pulser, Bio-Rad) (Miller et al., 1988). Anschließend wurde der Ansatz sofort in 1 ml SOC-Puffer (0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,2% (w/v) Trypton; 20 mM Glukose; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 10 mM NaCl) aufgenommen und für 20-40 Minuten bei

37°C unter Schütteln inkubiert, um die nötige Ampicillinresistenz für den Selektionsschritt auszubilden. Zur Selektion wurden die Zellen durch Zentrifugation für eine Minute bei 3000 xg sedimentiert, auf LBamp-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelklone wurden isoliert, in LBamp-Medium kultiviert und die Transformation der DNA überprüft (siehe 2.3.9).

2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) durch alkalische Lyse im kleinen (Plasmid-Minipräparation) oder großen Maßstab (Plasmid-Midipräparation). Dazu wurden *E. coli*-Zellen, welche das Plasmid enthielten, in LBamp-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert.

Plasmid-Minipräparation: Jeweils 1 ml einer *E. coli* Kultur wurde für 30 Sekunden bei 16000 xg zentrifugiert, das Zellpellet in 250 µl Lösung 1 (50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert und die Zellen mit 250 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) lysiert. Nach vorsichtigem Mischen und Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden 250 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat; pH 4,8) zugesetzt, nochmals fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 Minuten bei 16000 xg zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit 800 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 16000 xg pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml 70% Ethanol (- 20°C) gewaschen, getrocknet und in 10 µl sterilem Wasser gelöst.

Die Plasmid-Midipräparation erfolgte aus 50 ml Kultur mittels dem PureYield™ Midipreparations-Kit nach Anweisung des Herstellers (Promega).

2.3.10 Ethanol-fällung

DNA wurde aus wässrigen DNA-Lösungen durch Inkubation mit 300 mM Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol bei -20°C für 30 Minuten gefällt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 20000 xg für 30 Minuten sedimentiert, mit kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

2.3.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde über die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Dazu wurde DNA aus Plasmid-Midipräparationen 1:50 in Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die Konzentration der DNA wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von einem Programm des Spektrophotometers berechnet. Dabei entsprach die OD_{260} von eins einer DNA-Konzentration von 50 ng/ml.

2.3.12 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* isoliert oder genomische DNA der entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme mittel PCR amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Medigenomix (Martinsried, Deutschland) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977). Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide verwendet.

2.3.13 Klonierungsstrategien

pVT100U mtPho8, pVT100U cytPho8, pYX242 mtPho8, pYX242 cytPho8:

Für die Konstruktion der Plasmide pYX242 cytPho8 und pVT100U cytPho8 wurde ein Fragment von *PHO8* ohne die vakuoläre Signalsequenz (181-1701 Basenpaare) mittels PCR von genomischer DNA aus BY4742 amplifiziert. Dabei wurde ein neues Start-Codon am 5' Primerende eingefügt. Das Fragment wurde über die Schnittstellen AvrII und MluI in pYX242 und PstI/ BamHI in pVT100U (Vernet et al., 1987) ligiert. Für die Konstruktion des Plasmids pVT100U mtPho8 wurde das PCR-Fragment von *PHO8* (181-1701 Basenpaare) über die Schnittstellen KpnI und SacI ohne Start-Codon in den Vektor pVT100U mtGFP ligiert, nachdem das GFP-Insert heraus geschnitten wurde (Westermann und Neupert, 2000). Entsprechend enthielt der Vektor bereits ein Start-Codon und die mitochondriale Signalsequenz der Untereinheit 9 der ATPase aus *Neurospora crassa* (*SU9*, 1-207 Basenpaare). Das resultierende *SU9-PHO8*-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen MluI und SacI in pYX242 (Invitrogen) ligiert.

Primer Sequenzen:

pVT100U cytALP:

Primer 1: 5' CCCC CTG CAG ATGTCTGCATCACACAAGAAGAAGAAT GTC 3'

Primer 2: 5' CCCC GGA TCC TCAGTTGGTCAACTCATGG 3'

pYX242 cytALP:

Primer 1: 5' CCCC CCT AGG ATG TCTGCATCACACAAGAAGAAGAATGTC 3'

Primer 2: 5' CCCC ACG CGT
TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCAACTC
ATGGTAGTATTCG 3'

pVT100U mtALP:

Primer 1: 5' CCCC GGT ACC TCT GCA TCA CAC AAG AAG AAG AAT GTC 3'

Primer 2: 5' CCCC GAG CTC TCA GTT GGT CAA CTC ATG G 3'

pYX242 mtALP:

Primer 1: 5' CCCC ACG CGT ATGGCCTCCACTCGTGTCT 3'

Primer 2: 5' CCCC GAG CTC TCA GTT GGT CAA CTC ATG G 3'

pRS313 GFP-Atg8, pRS316 GFP-Atg8:

Für die Konstruktion der Plasmide pRS316 GFP-Atg8 und pRS313 GFP-Atg8 wurde das GFP-Atg8-Fragment mit den Schnittstellen XhoI und EcoRI aus pRS306 GFP-Atg8 geschnitten und über die gleichen Schnittstellen in pRS316 und pRS313 (Sikorski und Hieter, 1989) ligiert.

pRS416 515Fis1:

Für die Konstruktion von pRS416 515Fis1 wurde die Sequenz von *FIS1* einschließlich des Promotorbereiches von 515 Basenpaaren vor dem Startcodon und des Terminatorbereiches bis 238 Basenpaaren nach dem Stopcodon mittels PCR von genomischer DNA aus BY4742 amplifiziert. Das Fragment wurde anschließend über die Schnittstellen EcoRI und BamHI in den Vektor pRS416 (Sikorski und Hieter, 1989) ligiert.

Primer Sequenzen:

Primer 1: 5' CCCTTG GAATTC CGTTTGATGC 3'

Primer 2: 5' CCCC GGATCC CGCAATGTTG CTGTGACAAC CG 3'

pMalcRI MBP-Pho8:

Für die Konstruktion des Plasmids pMalcRI MBP-Pho8 zur Gewinnung eines MBP-Pho8-Fusionsproteins wurde ein DNA-Fragment von *PHO8* (574 – 1453 Basenpaare) mittels PCR von genomischer DNA aus BY4742 amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und SalI in pMalcRI ligiert. Dabei wurde ein Stopcodon am 3' Ende des zweiten Primers eingefügt.

Primer 1: 5' CCCC GGA TCC CTT ATC GCT ACG CAC CAG TTA GGC 3'

Primer 2: 5' CCCC GTC GAC CTA GTG ACC ATG CGT GGT CCA GCC 3'

Weitere verwendete Vektoren/Konstrukte:

Folgende Vektoren wurden freundlicherweise von anderen Forschungsgruppen zur Verfügung gestellt:

Yep213 Dnm1 K41A	2 μ , LEU2	(Otsuga et al., 1998)
Yep213 Dnm1 S42N	2 μ , LEU2	(Otsuga et al., 1998)
pHS12 mtDsRed.T3	CEN, ADH, LEU2	(Bevis und Glick, 2002)
pRS306 GFP-ATG8	URA3	H. Abeliovich
pRS323 mtDsRed.T4	2 μ , TPI HIS3	(Jakobs et al., 2003)
YPlac33 WHI2	CEN, URA3, 5' UTR WHI2	(Cheng et al., 2008)

2.4 Methoden der Hefegenetik

2.4.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stämme mit einer Gendeletion im Stammhintergrund BY4742 wurden von Euroscarf¹ bezogen. In diesen Stämmen war der Lokus des deletierten Gens durch die Sequenz eines Kanamycin-Resistenzgens ausgetauscht. Die Deletion wurde in diesen Deletionsstämmen mittels PCR überprüft. Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Hefestämme

Name	Stamm	Genotyp	Referenz
NM201	w303	w303 Mata <i>ade2-1; his3-11,15; leu2,112; trp1; ura23-53; can1-100</i>	(Sherman, 1991)
NM205	w303 Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3</i> [pHS12 mtDsRed.T3] [pVT100U mtPho8]	diese Arbeit
NM206	w303 Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3</i> [pHS12 mtDsRed] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM207	w303 Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM208	w303 Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM391	w303 Δ <i>pho8Δ<i>fis1</i></i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3 fis1::kanMX4</i>	diese Arbeit
NM409	w303 Δ <i>pho8Δ<i>fis1</i></i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3 fis1::kanMX4</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM407	w303 Δ <i>pho8Δ<i>fis1</i></i>	w303 Mata <i>pho8::HIS3 fis1::kanMX4</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM211	BY4742	BY4742 Mata <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; Ura3Δ0</i>	Euroscarf ¹
NM214	BY4742	BY4742 Mata [pRS316 GFP-Atg8] [pRS323 mtDsRed.T4]	diese Arbeit
NM215	<i>mgm1-5</i>	w303 Mata <i>mgm1-5 G408D</i>	(Wong et al., 2000)
NM216	<i>mgm1-5</i>	w303 Mata <i>mgm1-5</i> [pVT100U mtGFP]	diese Arbeit
NM217	<i>mgm1-5</i> Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>mgm1-5 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM218	<i>mgm1-5</i> Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>mgm1-5 pho8::HIS3</i> [pHS12_mtdSRed.T3] [pVT100U mtPho8]	diese Arbeit
NM219	<i>mgm1-5</i> Δ <i>pho8</i>	w303 Mata <i>mgm1-5 pho8::HIS3</i> [pHS12_mtdSRed] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM372	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM222	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i> [pHS12 mtDsRed.T3] [pVT100U mtPho8]	diese Arbeit
NM223	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i> [pHS12 mtDsRed.T3] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM225	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i> [pRS323 mtDsRed.T4] [pRS316 GFP-Atg8]	diese Arbeit
NM021	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM022	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM 6-1	Δ <i>pho8</i>	BY4742 Mata <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213] [pVT100U mtPho8]	diese Arbeit

¹ EUROpean Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis: siehe <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html> für weitere Informationen

Material und Methoden

NM380	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM 6	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213 Dnm1a] [pVT100U <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM378	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213 Dnm1a] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM233	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213 Dnm1K41A] [pVT100U <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM379	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213 Dnm1K41A] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM234	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213 Dnm1 S42N] [pVT100U <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM235	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [Yep213 Dnm1 S42N] [pVT100U <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM011	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [pRS416] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM012	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [pRS416][pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM236	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [YPLac33 <i>Whi2</i>] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM237	$\Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>pho8::kanMX4</i> [YPLac33 <i>Whi2</i>] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM242	$\Delta dnm1$	BY4742 Mat α <i>dnm1::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM246	$\Delta dnm1$	BY4742 Mat α <i>dnm1::kanMX4</i> [pRS316 GFP-Atg8] [pRS323 <i>mtDsRed.T4</i>]	diese Arbeit
NMR248	$\Delta dnm1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>dnm1::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM070	$\Delta dnm1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>dnm1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM071	$\Delta dnm1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>dnm1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM251	$\Delta uth1$	BY4742 Mat α <i>uth1::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM254	$\Delta uth1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>uth1::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM255	$\Delta uth1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>uth1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM256	$\Delta uth1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>uth1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM257	$\Delta fis1^*$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1</i>	Euroscarf ¹
NM261	$\Delta fis1^*$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1</i> [pRS316 GFP-Atg8] [pRS323 <i>mtDsRed.T4</i>]	diese Arbeit
NM373	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM044	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM043	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM091	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [pRS416 515Fis1] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM092	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [pRS416 515Fis1] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM095	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [pRS416] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM096	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [pRS416] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM093/072	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [YPLac33 <i>Whi2</i>] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM094/073	$\Delta fis1^* \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>fis1::kanMX4 whi2-1 pho8::HIS3</i> [YPLac33 <i>Whi2</i>] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM391	$\Delta fis1 \Delta pho8$	W303 Mat α <i>fis1::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM409	$\Delta fis1 \Delta pho8$	W303 Mat α <i>fis1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>mtPho8</i>]	diese Arbeit
NM407	$\Delta fis1 \Delta pho8$	W303 Mat α <i>fis1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U <i>mtGFP</i>] [pYX242 <i>cytPho8</i>]	diese Arbeit
NM292	$\Delta atg8$	BY4742 Mat α <i>atg8::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM294	$\Delta atg8 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>atg8::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit

Material und Methoden

NM297	$\Delta atg8 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg8::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM298	$\Delta atg8 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg8::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM303	$\Delta aup1$	BY4742 $Mata aup1::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM304	$\Delta aup1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata aup1::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM306	$\Delta aup1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata aup1::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM307	$\Delta aup1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata aup1::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM326	$\Delta mdv1$	BY4742 $Mata mdv1::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM327	$\Delta mdv1$	BY4742 $Mata mdv1::kanMX4$ [pRS316 GFP-Atg8] [pRS323 mtDsRed.T4]	diese Arbeit
NM329	$\Delta mdv1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata mdv1::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM03	$\Delta mdv1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata mdv1::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM04	$\Delta mdv1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata mdv1::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM330	$\Delta caf4$	BY4742 $Mata caf4::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM375	$\Delta caf4$	BY4742 $Mata caf4::kanMX4$ [pRS316 Atg8-GFP] [pRS323 mtDsRed.T4]	diese Arbeit
NM332	$\Delta caf4 \Delta pho8$	BY4742 $Mata caf4::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM050	$\Delta caf4 \Delta pho8$	BY4742 $Mata caf4::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM333	$\Delta caf4 \Delta pho8$	BY4742 $Mata caf4::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM343	$\Delta atg11$	BY4742 $Mata atg11::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM344	$\Delta atg11$	BY4742 $Mata atg11::kanMX4$ [pRS316 GFP-Atg8] [pRS323 mtDsRed.T4]	diese Arbeit
NM345	$\Delta atg11 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg11::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM346	$\Delta atg11 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg11::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM347	$\Delta atg11 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg11::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM348	$\Delta atg20$	BY4742 $Mata atg20::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM349	$\Delta atg20 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg20::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM350	$\Delta atg20 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg20::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM351	$\Delta atg20 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg20::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM352	$\Delta atg24$	BY4742 $Mata atg24::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM353	$\Delta atg24 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg24::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM354	$\Delta atg24 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg24::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM355	$\Delta atg24 \Delta pho8$	BY4742 $Mata atg24::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM356	$\Delta reg1$	BY4742 $Mata reg1::kanMX4$	Euroscarf ¹
NM357	$\Delta reg1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata reg1::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM358	$\Delta reg1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata reg1::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM359	$\Delta reg1 \Delta pho8$	BY4742 $Mata reg1::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM360	$\Delta pep4$	BY4742 $Mata pep4::kanMX4 pho8::HIS3$	Euroscarf ¹
NM361	$\Delta pep4 \Delta pho8$	BY4742 $Mata pep4::kanMX4 pho8::HIS3$	diese Arbeit
NM023	$\Delta pep4 \Delta pho8$	BY4742 $Mata pep4::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM024	$\Delta pep4 \Delta pho8$	BY4742 $Mata pep4::kanMX4 pho8::HIS3$ [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM364	$\Delta whi2$	BY4742 $Mata whi2::kanMX4$	Euroscarf ¹

NM365	$\Delta whi2$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4</i> [pRS316 GFP-Atg8] [pRS323 mtdSRed.T4]	diese Arbeit
NM366	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM041	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM042	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM064	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [YPLac33 Whi2] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM065	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [YPLac33 Whi2] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM101	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pRS416] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM102	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pRS416 leer] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM097	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pRS416 Fis1] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM100	$\Delta whi2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>whi2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pRS416 Fis1] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM436	$\Delta msn2$	BY4742 Mat α <i>msn2::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM437	$\Delta msn2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>msn2::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM444	$\Delta msn2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>msn2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM445	$\Delta msn2 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>msn2::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM438	$\Delta msn4$	BY4742 Mat α <i>msn4::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM439	$\Delta msn4 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>msn4::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM446	$\Delta msn4 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>msn4::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM447	$\Delta msn4 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>msn4::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit
NM440	$\Delta psr1$	BY4742 Mat α <i>psr1::kanMX4</i>	Euroscarf ¹
NM441	$\Delta psr1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>psr1::kanMX4 pho8::HIS3</i>	diese Arbeit
NM448	$\Delta psr1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>psr1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 mtPho8]	diese Arbeit
NM449	$\Delta psr1 \Delta pho8$	BY4742 Mat α <i>psr1::kanMX4 pho8::HIS3</i> [pVT100U mtGFP] [pYX242 cytPho8]	diese Arbeit

2.4.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefestämme wurden nach Standardprotokollen kultiviert (Sherman, 1991). Die Lagerung erfolgte in 15% (v/v) Glycerol in Wasser bei -80°C (Stocklösung). Für die Kultivierung bestimmter Hefestämme wurde jeweils ein Stück der gefrorenen Stocklösung entnommen, auf entsprechenden Kulturplatten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Hefestämme ohne Plasmid wurden auf YP-Medium kultiviert. Hefestämme, die ein bestimmtes Plasmid mit einem Selektionsmarker-Gen enthielten, wurden auf Selektivmedium, kultiviert. Den Selektivmedien fehlten dabei entsprechende Aminosäuren oder Basen, sodass nur die Hefezellen, die das gewünschte Plasmid enthielten wachsen konnten. Als Kohlenstoffquellen wurde für fermentatives Wachstum Glukose oder Galaktose, für

respiratorisches Wachstum Glycerin mit 0,1% Glukose verwendet. Flüssigkulturen wurden bei 140 rpm und 30°C inkubiert. Zur Anfertigung von Stocklösungen wurden die Stämme auf Kulturplatten kultiviert und ein Teil der Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze in 15% (v/v) Glycerollösung suspendiert. Die Stocklösungen wurden bei -80°C gelagert.

2.4.3 Transformation von *S.cerevisiae* mit DNA

Für die Transformation mit DNA wurde der entsprechende Hefestamm in YPD über Nacht bei 30°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden mit der Vorkultur 50 ml Medium auf ca. 0,1 OD₆₀₀ angeimpft und weiter bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis diese Kultur eine OD₆₀₀ von 0,3-0,5 erreicht hatte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 xg für fünf Minuten sedimentiert, der Überstand verworfen, mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 13000 xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Für jede Transformation wurden 50 µl dieser Suspension in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 xg für 15 Sekunden in der Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Hefezellen wurden mit 240 µl PEG 3350 (50% (w/v)) überschichtet und mit 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) sowie 5-10 µl der zu transformierenden DNA und einer entsprechenden Menge (70-75µl) an sterilem Wasser versetzt. Die Ansätze wurden anschließend kräftig mittels Vortex durchmischt, um die Zellen zu resuspendieren. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 30°C wurden die Zellen bei 42°C für 20 Minuten einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für 15 Sekunden bei 13000 xg und Raumtemperatur sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen, um sie auf Kulturplatten mit Selektiv-Medium auszubringen (Gietz et al., 1995). Die Selektion erfolgte über die entsprechenden Auxotrophiemarker oder Kanamycin-Resistenz (Geneticin, G418). Diente eine Kanamycin-Resistenz zur Selektion, wurden die Hefezellen vor dem Ausplattieren für drei Stunden bei 30°C in YPD-Medium inkubiert, um die Resistenz auszubilden. Die Gen-Expression von transformierten Plasmiden wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.5.3) oder SDS-PAGE (siehe 2.6.3) und Westernblot (siehe

2.6.4; 2.7.3) analysiert. Die Kontrolle der Deletion erfolgte ebenfalls über SDS-PAGE und Westernblot und PCR (siehe 2.3.2).

2.4.4 Gendeletionen in *S. cerevisiae*

2.4.4.1 Deletion von *PHO8*

Zur Deletion von *PHO8* wurde der entsprechende Lokus ab 498 Basenpaaren vor dem Startcodon bis 179 Basenpaaren nach dem Stopcodon durch die kodierende Sequenz des Selektionsmarkers *HIS3* aus *Schizosaccharomyces Pombe* ausgetauscht. Die Selektionsmarker-Sequenz wurde mit folgenden Primern vom Plasmid pFA6aHISMx6 mittels PCR amplifiziert:

Primer Sequenzen:

Primer 1: 5' AGA CCA CAG GGT AGT CAA CAG CAG CGG CAA CAA CGA
CAA AAT GCG CGT CGT ACG CTG CAG GTC GC 3'

Primer 2: 5' CGA GAT TTC ACT TCT TCA CGC TAT AGA ATG CAC CTA AAA
CTC GCC ATC GAT GAA TTC GAG CTC 3'

Das PCR-Fragment wurde in die entsprechenden Stämme transformiert und die Deletion mittels PCR und Westernblot überprüft.

2.4.4.2 Deletion von *FIS1* im W303-Stammhintergrund

Zur Deletion von *FIS1* wurde der entsprechende Lokus mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert, welche aus dem BY4742 $\Delta fis1$ Deletionsstamm der Firma Euroscarf isoliert wurde. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

Primer 1: 5' TTGTTTCAGCATCGCTATCGC 3'

Primer 2: 5' CATCTT GTCGTTTGGTCCTCG 3'

Das erhaltene PCR-Fragment wurde in W303 *PHO8::HIS3* transformiert und die Deletion mittels PCR und Western blot überprüft.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen aus *E. coli* über Amylose-Resin

Der entsprechende *E. coli*-Stamm wurde bei 37°C in LBamp-Medium kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression durch 1 mM IPTG induziert und für weitere vier Stunden bei 24°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen der Kultur durch Zentrifugation bei 2000 xg für 10 Minuten pelletiert und einmal mit Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 20 ml Säulenpuffer (20 mM HEPES; pH 7,4; 200 mM NaCl; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF) resuspendiert, mit 20 mg Lysozym versetzt und für 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend bei 18000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Säulenfluss von 0,5 ml/min auf eine Amylose-Resin-Säule gegeben, welche zuvor mit dem 6-fachen Säulenvolumen an Säulenpuffer äquilibriert wurde. Die Säule mit dem gebundenen MBP-Fusionsprotein wurde nochmal mit dem 6-fachen Säulenvolumen an Säulenpuffer gewaschen und anschließend das gebundene Protein mit 10 ml Elutionspuffer (20 mM HEPES; pH 7,4; 200 mM NaCl; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF; 10 mM Maltose) eluiert. Das Elutionsvolumen wurde fraktioniert und die Konzentration des eluierten Proteins in den Fraktionen nach Bradford (siehe 2.6.2) ermittelt.

2.5.2 Färbung des Zytoskeletts in *S. cerevisiae*

Die Hefestämme wurden kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 durch Zugabe von Formaldehyd (frisch hydrolisiert aus para-Formaldehyd) entsprechend einer Endkonzentration von 3,7% chemisch fixiert. Dabei wurden die Kulturen im Schüttler belassen und danach für weitere 30-60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 13000 xg in einer Tischzentrifuge für 30 Sekunden sedimentiert und zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert, mit 10 µl Alexa-Phalloidin 586 versetzt und für mindestens zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, die Zellen in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe 2.5.3).

2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit einer CCD-Kamera (Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA) und der dazugehörigen Software (MetaView 3.6a; Universal Image Corporation, USA) gemacht. Es wurde ein Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan Neofluar, 100x, numerische Apertur 1,3) verwendet. Für die Analyse von mtGFP wurde der Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: > 515 nm). Für die Analyse von mtDsRed und Alexa-Fluor Phalloidin 568 wurde der Filtersatz No. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: > 590 nm) (Matz et al., 1999).

2.5.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung von Mitophagie und Autophagie mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden die entsprechenden Hefestämme mit mtDsRed (pRS313 mtDsRed.T4) und GFP-Atg8 transformiert und in SG-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen für 7,5 Stunden mit DMSO oder 1 μ M Rapamycin behandelt und sofort mit 2% Agarose auf Objektträgern fixiert. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Nikon mit dem 1.49 Öl-Immersionsobjektiv (1.49 APO TIRF 60x) unter einer im Mikroskop integrierten unmittelbaren 1,5-fachen Vergrößerung. Die Anregung des Fluorophors GFP erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm und die Detektion von 515 nm bis 530 nm. Die Anregung des Fluorophors DsRed erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei 543 nm und Detektion von 605 nm bis 675 nm. Die Aufnahmen einzelner Bilder erfolgten mit einer Lochblendeneinstellung von 60 μ m, 0,062 fps und einer zusätzlichen 4,4-fachen Vergrößerung. Die Bilder wurden aus drei gemittelten Aufnahmen mit 1024 x 1024 Pixeln erstellt. Der Hintergrund wurde mit geeigneten Bildsättigungsparametern mittels der Software EZ-C1 v. 3.70 (Nikon) und Image J minimiert.

Bilder-Stapel zur Quantifizierung von Mitophagie und Autophagie wurden mit folgenden Einstellungen aufgenommen: Lochblende 60 μ m, 0,169 fps, 0,4 μ m Stapel-Abstand, 1024 x 1024 pixel. Die Bilderstapel wurden mit der EZ-C1-Software gerendert.

2.5.5 Gesamtproteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Der Aufschluss von Hefezellen zur Extraktion von Gesamtzellprotein erfolgte durch alkalische Lyse. Dazu wurde ein Äquivalent von ein bis vier OD₆₀₀ Zellen sedimentiert, einmal mit Wasser gewaschen und in 250 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 50 µl Lysepuffer (1,85 M NaOH; 7,4% (v/v) β-Mercaptoethanol; 20 mM PMSF) versetzt, mittels Vortex gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert (modifiziert nach Yaffe und Schatz, 1984). Die Proteine wurden durch Zugabe von 60 µl 72% (w/v) TCA gefällt. Dazu wurden die Proben erneut mittels Vortex gemischt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 16000 xg bei 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 1 ml eiskaltem Aceton (-20°C) gewaschen, erneut zentrifugiert und bei 37°C getrocknet. Das Proteinpellet wurde in SDS-Probenpuffer gelöst und über SDS-PAGE und Westernblot (siehe 2.6.3; 2.6.4; 2.7.3) analysiert.

2.5.6 Subfraktionierung von Hefezellen

Die Generierung von Sphaeroblasten erfolgte im Wesentlichen wie zuvor beschrieben (Daum *et al.*, 1982; Caplan und Douglas, 1991). Die entsprechenden Stämme wurden in SG-Medium kultiviert und die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 xg in einem JLA-8.1000-Rotor sedimentiert, mit 300 ml Wasser gewaschen und nochmals für fünf Minuten bei 2700 xg sedimentiert. Das Nassgewicht der Zellen wurde ermittelt und im entsprechenden Volumen an DTT-Puffer (0,5 g Nassgewicht/ml; 10 mM DTT, 100 mM Tris/SO₄; pH 9,4) aufgenommen. Die Suspension wurde für 15 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 2700 xg für fünf Minuten sedimentiert. Das Zellpellet wurden in 100 ml Sorbitol-Puffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM KPi; pH 7,4) gewaschen und mit einer Endkonzentration von 0,15 g Nassgewicht/ml in Sorbitol-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde entsprechend dem Nassgewicht mit Zymolyase (3 mg/g) versetzt und 30-60 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Dabei wird die Zellwand der Hefezellen hydrolysiert und es bilden sich Sphaeroblasten, welche durch das Sorbitol im Puffer vor dem osmotischen Platzen geschützt sind. Zur Kontrolle der Sphaeroblastenbildung wurden je 20 µl der Suspension in 1 ml Wasser oder Sorbitol-Puffer resuspendiert und die Differenz der OD₆₀₀ ermittelt. Eine ausreichende Sphaeroblastierung ergab eine Differenz von mindestens 90%.

Nach der Sphaeroblastierung wurden alle weiteren Schritte bei 4°C durchgeführt. Die Sphaeroblastensuspension wurde für fünf Minuten bei 2700 xg zentrifugiert und die

Sphaeroblasten in Lysepuffer (0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2% (w/v) fettsäurefreies BSA; 20 mM HEPES/KOH; pH 7,4) auf eine Endkonzentration von 0,15 g/ml Nassgewicht resuspendiert. Der Aufschluss der Sphaeroblasten erfolgte durch Homogenisieren mit einem Dounce-Homogenisator, wobei der Kolben 20-mal auf und ab bewegt wurde. Nach diesem Schritt wurde eine Probe (Gesamtzellprotein) genommen. Um nicht aufgeschlossene Zellen, Zellkerne und Zellhüllen abzutrennen, wurde das Lysat bei 3000 xg für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Für eine grobe Abtrennung der Mitochondrien vom Zytosol wurde der Überstand für 12 Minuten bei 11000 xg zentrifugiert, der Überstand als zytosolische Fraktion gesammelt und das Mitochondrien-Pellet in Sorbitolpuffer aufgenommen. Anschließend wurde nochmals eine Zentrifugation bei 3000 xg und 11000 xg vorgenommen, um die Mitochondrien zu reinigen. Die zytosolische Fraktion wurde durch Zentrifugation bei 90000 xg für 30 Minuten gereinigt.

Für eine vollständige Zellfraktionierung wurde das Sediment nach Zentrifugation bei 3000 xg verworfen und der Überstand in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte diente der Isolierung von Mitochondrien und Zytoplasma, die andere der Isolierung von Vakuolen.

Präparation von Zytoplasma und Mitochondrien:

Die Mitochondrien wurden zunächst durch fraktionierte Zentrifugation aus dem Zellhomogenisat konzentriert. Dazu wurde der Überstand bei 11000 xg für 12 Minuten zentrifugiert. Der danach erhaltene Überstand, welcher dem Zytoplasma entsprach, wurde durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 90000 xg nochmals gereinigt. Die sedimentierten Mitochondrien wurden zur Erhöhung der Reinheit in 4 ml SET-Puffer (60% w/v Saccharose; 10 mM Tris/HCl; pH 7,5) resuspendiert, mit 60% (w/v), 55% (w/v), 44% (w/v), 30% (w/v) Saccharose in SET-Puffer überschichtet und bei 126444 xg für 2,5 Stunden zentrifugiert. Die gereinigten Mitochondrien wurden von der Interphase zwischen 44% und 55% Saccharose geerntet, mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 auf das 4-fache Volumen verdünnt, bei 11000 xg für 10 Minuten zentrifugiert und in HS-Puffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES/KOH; pH 7,4) resuspendiert.

Präparation von Vakuolen:

Die Isolierung der Vakuolen erfolgte über einen 4-stufigen Ficoll-Gradienten wie zuvor beschrieben (Haas, 1995). Dazu wurde die zweite Hälfte des homogenisierten Überstands

bei 11000 xg für 12 Minuten zentrifugiert, um die Zellorganellen zu sedimentieren. Das Pellet wurde in 2,5 ml PS-Puffer (10 mM Pipes/KOH; pH6,8; 0,6 M Sorbitol) mit 15% Ficoll resuspendiert, mit 15% (w/v), 8% (w/v), 4% (w/v), 0% (w/v) Ficoll in PS-Puffer überschichtet und bei 126444 xg für 2,5 Stunden zentrifugiert. Die Vakuolen wurden von der Interphase zwischen 4% und 0% Ficoll geerntet, bei 11000 xg für 10 Minuten zentrifugiert und in HS-Puffer resuspendiert.

Die Proteinkonzentration der Zellfraktionen wurde nach der Bradford-Methode (siehe 2.6.2) ermittelt. Die Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.7 Sublokalisierung der alkalischen Phosphatase

Zur Überprüfung der Lokalisation der alkalischen Phosphatase in der mitochondrialen Matrix wurde die Mitochondriensuspension auf eine Proteinkonzentration von 0,2 µg/µl in HS-Puffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES/KOH; pH 7,4) oder HST-Puffer (HS-Puffer; 1% TritonX 100) verdünnt. Dabei sollten die Mitochondrien in HS-Puffer intakt bleiben und in HST-Puffer solubilisiert werden. Anschließend wurde 100 µg/ml Proteinase K zu den Proben gegeben und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Die Protease-Behandlung wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF terminiert und nochmals auf Eis für fünf Minuten inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 11000 xg und 4°C sedimentiert, mit 1 mM PMSF in HS-Puffer gewaschen ohne zu resuspendieren und in HS-Puffer aufgenommen. Um jeglichen weiteren proteolytischen Verdau von Proteinen zu vermeiden, wurden die Proben einer Fällung mit TCA unterzogen (siehe 2.5.5). Das Sediment wurde in SDS-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Westernblot (siehe 2.6.3; 2.6.4; 2.7.3) analysiert.

2.5.8 Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie mittels Aktivierung von zytosolischer oder mitochondrial lokalisierter alkalischer Phosphatase (ALP-Assay)

Zur Bestimmung von Autophagie wurden die entsprechenden Hefestämme mit cytPho8 transformiert, zur Bestimmung von Mitophagie mit mtPho8. Die Stämme wurden in SG-Medium kultiviert und für verschiedene Zeiten mit 1 µM Rapamycin inkubiert oder nach

zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser in stickstofffreies Medium (SG-N, SD-N) überführt. Nach der Inkubation wurde ein Äquivalent von vier OD₆₀₀ Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde einmal in 0,2 mM PMSF-Lösung gewaschen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets in 200 µl Aufschlusspuffer (10 mM MgCl₂; 0.1 M KAc; 50 mM KCl; 10 nM ZnSO₄; 0.5% TritonX-100; 1 mM PMSF; 20 mM Pipes; pH 7,0) resuspendiert, mit dem genau gleichen Volumen an Glasperlen (0,25 g) versetzt und entweder für vier Minuten mit dem Vortex oder für 10 Sekunden mit dem Precellys aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde mit 100 µl Aufschlusspuffer verdünnt, bei 13000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß oder in eine 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (siehe 2.6.1) bestimmt. Für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.6.3; 2.6.4) und Westernblot (2.7.3) wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 7,5 bis 10 µg Protein geladen.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Verdünnungen der Zelllysate (siehe 2.5.8) erstellt und entsprechend der Anweisungen des Herstellers (Pierce) mit einer Mischung aus BCA-Reagenz A und 4% Kupfersulfatlösung (CuSO₄* 5 H₂O) im Verhältnis 50+1 bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde bei 560 nm gemessen und die Proteinkonzentration über eine Standard-Reihe ermittelt. Dazu wurde die Proteinkonzentration aus drei Verdünnungen gemittelt. Zur Bestimmung der mtPho8- oder cytPho8-Aktivität wurden die Verdünnungen der Zelllysate mit dem 24-fachen Volumen an Reaktionspuffer (40 mM MgCl₂; 0.5% TritonX-100; 4 mM p-Nitrophenylphosphat; 0,25 M Tris/HCL; pH 8,5) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an Stopp-Puffer (2 M Glycin/NaOH; pH 11) gestoppt und die Absorption bei 405 nm bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde aus der gemittelten Absorption von zwei Verdünnungen über den Extinktionskoeffizienten von Nitrophenolat und der Proteinkonzentration berechnet und wie angegeben zur Aktivität des Kontrollstamms normalisiert.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Wenn nicht anders angegeben wurde zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen die Methode von Bradford verwendet (Bradford, 1976). Die Proben wurden dazu mit jeweils 1 ml eines 1:5 verdünnten Farbstoffkonzentrates (Bio-Rad-Proteinassay-Reagenz, Biorad) versetzt und mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde mit einer Standard-Proteinlösung (bovines IgG, Biorad) eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe errechnet wurde.

2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse wurden Proteine durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe getrennt (Laemmli, 1970). Entsprechend der Größe des Zielproteins und der Auflösung wurden Gelsysteme zwischen 8% / 0,14% (w/v) und 16% / 0,26% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid und einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Im Sammelgel wurden 5% / 0,08% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid eingesetzt. Die Proteinproben wurden zuvor in SDS-Puffer (2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β -Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und durch Inkubation bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Generell wurden Probenvolumina zwischen 30-50 μ l mit Proteinmengen von 7,5 bis 100 μ g pro Spur geladen. Zum Abschätzen der Proteingrößen wurde bei jedem Lauf ein Proteinstandard (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 2,5 Stunden bei 25-30 mA durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele aus den Glasplatten gelöst und für den Transfer auf Nitrozellulose verwendet (siehe 2.6.4). Im Folgenden ist die Zusammensetzung der Gele und des Laufpuffers aufgeführt.

Sammelgel: 5% (w/v) Acrylamid/ 0,08% (w/v) Bisacrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED; 60 mM Tris/HCl pH 6,8

Trenngellösung: 8-16% (w/v) Acrylamid/ 0,14-0,26% (w/v) Bisacrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,03 % (v/v) TEMED; 375 mM Tris/HCl pH 8,8

Laufpuffer: 380 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl pH 8,3

2.6.4 Proteintransfer aus Gelen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Für die Immundetektion von Proteinen wurden diese zunächst in einem SDS-PAGE-Gel getrennt und anschließend elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (Westernblot) (Towbin et al., 1979). Vor dem Transfer wurden das Gel und die Membran für fünf Minuten in Transferpuffer (150 mM Glycin; 20% (v/v) Ethanol; 0,02% (w/v) SDS; 20 mM Tris) vorinkubiert. Die Assemblierung des Blots erfolgte auf der Anode (untere Graphitelektrode), wobei ein Filterpapier mit Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Elektrode aufgebracht, die Membran und das Gel darüber gelegt und zum Abschluss ein weiteres in Puffer getränktes Filterpapier aufgebracht wurde. Anschließend wurden alle Lagen unter leichtem Druck geglättet, um Luftblasen zu entfernen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 200 mA für 90 Minuten. Danach wurden die Proteine auf der Membran durch Inkubation für fünf Minuten mit Ponceau S (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) Essigsäure) angefärbt, um die Markerproteine einzuzeichnen und die Gleichmäßigkeit des Transfers abzuschätzen. Überschüssiges Ponceau S wurde durch Waschen mit entionisiertem Wasser entfernt. Die Membran wurde vor der weiteren Verwendung in TBS-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4) entfärbt.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Um polyklonale Antikörper gegen Pho8 zu gewinnen, wurde ein Kaninchen mit einem MBP-Pho8 Fusionsprotein, welches zuvor aus *E. coli* isoliert wurde (siehe 2.5.1), immunisiert.

Zur Erstinjektion wurden 200 µl (1 µg/µl) des gereinigten Fusionsproteins mit gleichem Volumen TiterMax GoldTM versetzt (Sigma), drei Minuten mittels Vortex gemischt und dem Kaninchen an mindestens drei Stellen im Nacken subkutan gespritzt. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von vier Wochen, wobei Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma) anstelle von TiterMax verwendet wurde. Acht bis zehn Tage nach der Injektion mit Freund's Adjuvant Incomplete wurde dem Kaninchen über die Ohrarterie 20-25 ml Blut entnommen. Nach dem Gerinnen des Blutes und Zentrifugation bei 3000 xg für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde das Serum abgenommen. Zur weiteren Reinigung

wurde das Serum nochmals für 12 Minuten bei 12000 xg zentrifugiert, in ein neues 15 ml Schraubdeckelreagenzgefäß überführt und 20 Minuten auf 56°C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.7.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Affinitätsreinigung eines Antikörpers erfolgte mittels Sulfolink Coupling Gel (Pierce). Dazu wurde das Säulenmaterial mit dem immunogenen Peptid, welches für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurde, gekoppelt. Die Säule wurde nacheinander mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5), 10 mM Tris/HCl (pH 8,8), 100 mM Natriumphosphat (pH 11,5) und erneut mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen. Für die Bindung der Antikörper wurden 4 ml Serum mit 16 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gemischt und mit 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM o-Phenanthrolin sowie 1 µg/ml Leupeptin versetzt, um möglicherweise enthaltene Proteasen zu inhibieren. Die Antikörperlösung wurde dreimal mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 20 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und dann mit 20 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte durch Zugabe von je 10 ml 100 mM Citrat (pH 4,0), 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5) und 100 mM Natriumphosphat (pH 11,5), sodass der pH-Wert stetig abgesenkt wurde. Es wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt, welche mit 1 M Tris/Base (bei Citrat- und Glycinelution) bzw. 1 M Glycin/HCl (pH 2,5) (bei Natriumphosphatelution) neutralisiert wurden. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde nach Bradford (siehe 2.6.2) bestimmt. Die Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden vereinigt und bei -20°C gelagert. Zur Aufbewahrung der Säule wurde diese mit dem 10-fachen Säulenvolumen Puffer (0,02% (w/v) Natriumazid; 10 mM Tris/HCl; pH 7,5) gewaschen, mit 1 ml des gleichen Puffers überschichtet und bei 4°C gelagert.

2.7.3 Immundetektion von Proteinen

Proteine wurden für den immunologischen Nachweis (Westernblot, Immunoblotting) zunächst über SDS-PAGE (siehe 2.6.3) aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen transferiert (siehe 2.6.4). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran in MTBS (5% (w/v) Magermilchpulver; 150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln abgesättigt. Anschließend wurden die Membranen mit in MTBS verdünnten Antikörper- bzw. Antiseren-Lösungen (Primärer Antikörper) für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Verdünnung des Primärantikörpers in der MTBS-Lösung richtete sich nach dem Titer des Serums; für ungereinigte Seren betrug die Verdünnung zwischen 1:1000 und 1:5000, für affinitätsgereinigte Seren 1:250 bis 1:500. Um unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde dreimal für ca. fünf Minuten in TBS-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4) gewaschen. Danach erfolgte eine zweite Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in MTBS. Dieser enthielt gegen Kaninchen-Immunglobulin-G gerichteten und mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-HRP Konjugat, Biorad). Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Die über die beiden Antikörper an das Zielprotein gebundene Meerrettich-Peroxidase wurde über Chemilumineszenz mit einem Röntgenfilm (Fuji) nachgewiesen. Für die Nachweisreaktion wurde die Membran in einer Mischung aus gleichen Volumina einer Luminollösung (0,044% (w/v) Luminol; 0,0066% (w/v) p-Cumarinsäure; 100 mM Tris/HCl; pH 8,5) und einer H₂O₂-Lösung (0,024% (w/v) H₂O₂; 100 mM Tris/HCl; pH 8,5) für ein bis zwei Minuten inkubiert und anschließend in einer Klarsichtfolie fixiert. Die Chemilumineszenz wurde durch Auflegen des Röntgenfilms für 10 Sekunden bis 10 Minuten erfasst.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der enzymatischen Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie

3.1.1 Lokalisation der alkalischen Phosphatase

Die Quantifizierung von Mitophagie und Autophagie erforderte zunächst die Etablierung einer verlässlichen und objektiven Bestimmungsmethode. Dafür wurde der Alkalische-Phosphatase-Assay (ALP-Assay), eine bereits verwendete enzymatische Methode zur Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie etabliert (Noda *et al.*, 1995; Campbell und Thorsness, 1998). Die Anwendung erforderte die Deletion der endogenen alkalischen Phosphatase *PHO8*. Anschließend wurden modifizierte Varianten von Plasmiden exprimiert, in welchen die vakuoläre Signalsequenz entweder deletiert (cytPho8) oder durch eine mitochondriale Signalsequenz (mtPho8) ausgetauscht wurde (Abbildung 11). Dadurch verbleibt das Enzym als inaktive Vorstufe entweder im Zytoplasma oder in Mitochondrien. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurde als Expressionssystem ein Plasmid mit 2 μ Replikationsursprung und ein Promotor für starke Überexpression gewählt. Durch Induktion von Autophagie bzw. Mitophagie gelangt die inaktive Vorstufe der Phosphatase aus dem Zytoplasma bzw. über die Mitochondrien in die Vakuole, wo sie durch Proteinase A (PEP4) aktiviert wird. Die cytPho8-Aktivität ist somit ein Maß für Autophagie, die mtPho8-Aktivität ein Maß für Mitophagie. Die korrekte Lokalisation von mtPho8 und cytPho8 wurde über Zellfraktionierung und SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Als Markerproteine für die einzelnen Fraktionen dienten Tom20 (Mitochondrien), Bmh2 (Zytoplasma) und Vam3 (Vakuolen). Das Ergebnis zeigt, dass mtPho8 in den Mitochondrien und cytPho8 im Zytoplasma angereichert waren. Es waren keine Spuren von mtPho8 oder cytPho8 in der Vakuole nachweisbar (Abbildung 12A). Weiterhin wurde die submitochondriale Lokalisation von mtPho8 näher untersucht. Dazu wurden isolierte Mitochondrien als intakte Organellen in isoosmotischem Puffer oder solubilisiert in Triton-haltigem Puffer mit Proteinase K behandelt (Abbildung 12B). In intakten Mitochondrien waren sowohl mtPho8 als auch MPP (*mitochondrial processing protease*), ein Protein der Matrix, vor Abbau geschützt, während Tom20 als Protein der

mitochondrialen Außenmembran abgebaut wurde. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass mtPho8 in Mitochondrien lokalisiert ist.

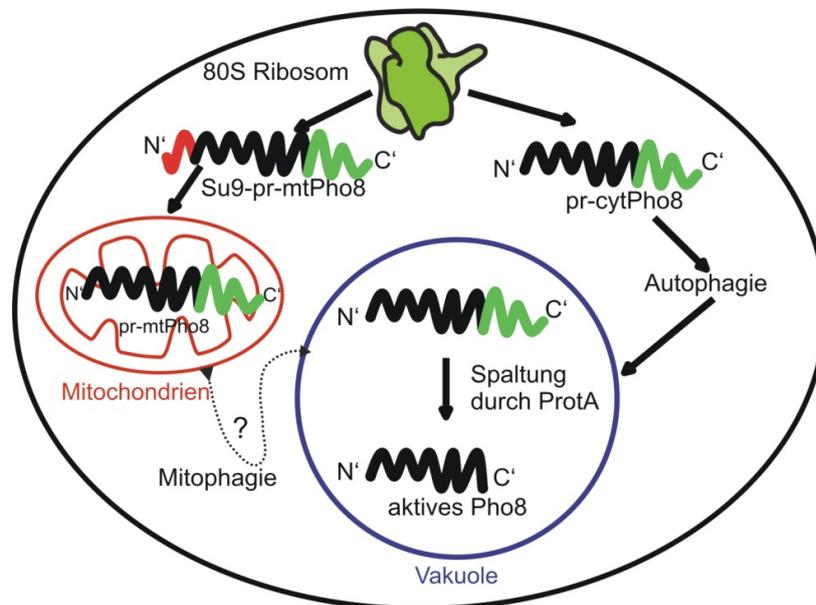


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Bestimmung der Autophagie und Mitophagie mittels Aktivierung von zytosolisch oder mitochondrial lokalisierter ALP (ALP-Assay). Die Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie erfolgte über einen enzymatischen Assay (Noda et al., 1995; Campbell und Thorsness, 1998). Die inaktive Pho8-Vorstufe wurde entweder durch eine mitochondriale Signalsequenz in Mitochondrien (Su9-pr-mtPho8) oder durch Deletion der ursprünglichen vakuolären Signalsequenz (pr-cytPho8) ins Zytoplasma sortiert. Die Aktivierung der Vorstufe erfolgt in Abhängigkeit der Autophagie in der Vakuole über proteolytische Spaltung durch die vakuoläre Protease A (PEP4). Mitophagie bzw. Autophagie wurden über die mtPho8- bzw. cytPho8-Aktivität bestimmt. Die vakuolär lokalisierte endogene Phosphatase *PHO8* wurde in allen Stämmen deletiert, um die Hintergrundaktivität zu minimieren.

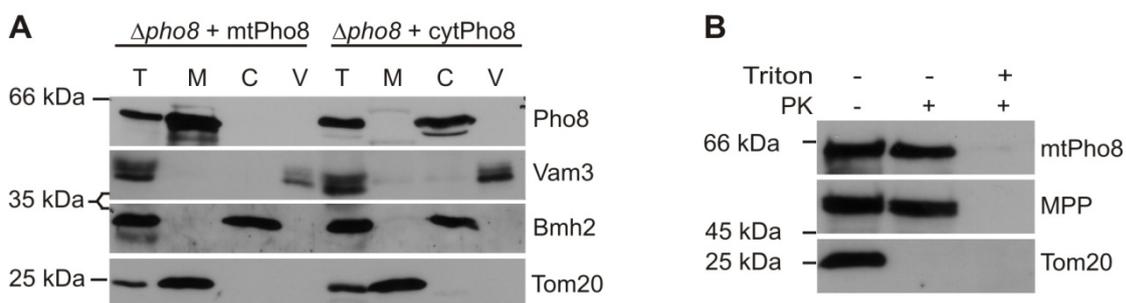


Abbildung 12: Lokalisation von Pho8 in verschiedenen Hefestämmen zur Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie. **A** Die angegebenen Stämme wurden einer Zellfraktionierung unterzogen und die gereinigten Fraktionen über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Ladeschema: Gesamtzellextrakt entsprechend 0,4 OD_{600nm} (T), Mitochondrien entsprechend 40 µg Protein der mitochondrialen Fraktion (M), Zytoplasma entsprechend 0,4 OD_{600nm} (C), Vakuolen entsprechend 100 OD_{600nm} (V). **B** Mitochondrien wurden aus $\Delta pho8 + mtPho8$ isoliert, in HS- oder HST-Puffer mit Proteinase K inkubiert und über SDS-PAGE und Westernblot auf Zugänglichkeit der Proteinase analysiert.

3.1.2 Bestimmung der unspezifischen ALP Aktivierung

Der ALP-Assay beruht auf der spezifischen Aktivierung von Pho8 in der Vakuole. Es wurde daher überprüft, ob mtPho8 in Mitochondrien als inaktives Zymogen vorliegt. Inaktives Pho8 kann *in vitro* durch Verdauung mit geringen Mengen Proteinase K aktiviert werden. Mitochondrien wurden aus dem mtPho8-exprimierenden Wildtyp isoliert und die mtPho8-Aktivität vor bzw. nach Behandlung mit Proteinase K bestimmt. Die mtPho8-Aktivität nach Behandlung mit Proteinase K war gegenüber den unbehandelten Mitochondrien ca. zehnfach erhöht (Abbildung 13). In der Wildtyp-Kontrolle konnte sowohl vor als auch nach Behandlung mit Proteinase K keine nennenswerte Phosphatase-Aktivität gemessen werden. Daraus lässt sich schließen, dass mtPho8 tatsächlich als inaktives Zymogen in Mitochondrien vorliegt.

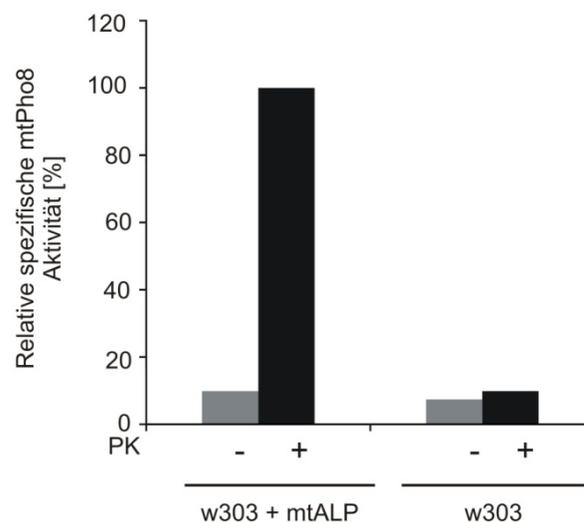


Abbildung 13: mtPho8 liegt in Mitochondrien als inaktives Zymogen vor. Mitochondrien wurden aus dem Wildtyp bzw. aus dem mtPho8-exprimierenden Wildtyp isoliert, in Tritonpuffer solubilisiert und die mtPho8-Aktivität vor oder nach Inkubation mit Proteinase K für 15 min enzymatisch bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen einem repräsentativen Experiment relativ zu Proteinase K-aktiviertem Lysat der Mitochondrien des mtPho8-exprimierenden Stamms.

Weiterhin wurde untersucht, ob während des Zellaufschlusses eine unspezifische Aktivierung des freigesetzten inaktiven Pho8 durch Proteinase A (PEP4) *in vitro* erfolgt. Dazu wurden die Stämme $\Delta pho8$ und $\Delta pep4$ in YPG kultiviert und die geernteten Zellen entweder separat oder als Gemisch von Zellen beider Stämme aufgeschlossen. Während des Aufschlusses wird im Zellgemisch beider Stämme endogenes inaktives Pho8 aus $\Delta pep4$ und Proteinase A aus $\Delta pho8$ freigesetzt, was eine unspezifische Aktivierung von

endogenem Pho8 ermöglicht. Nach dem Aufschluss wurde in den Lysaten ohne oder mit Proteinase K-Behandlung für null oder fünf Minuten die Phosphatase-Aktivität bestimmt. Vor der Behandlung mit Proteinase K wies das Lysat aus dem Zellgemisch beider Stämme keine wesentlich höhere Phosphatase-Aktivität auf als die Lysate der separat aufgeschlossenen Deletionsstämme (Abbildung 14). Nach Behandlung der Lysate aus dem Zellgemisch und $\Delta pep4$ mit Proteinase K erhöhte sich deren Aktivität auf das Fünf- bis Zehnfache, was beweist, dass endogenes Pho8 vorhanden war und auch nach dem Aufschluss als inaktives Zymogen vorliegt. Eine unspezifische Aktivierung der inaktiven Vorstufe von Pho8 im Zelllysat während des Aufschlusses kann somit ausgeschlossen werden.

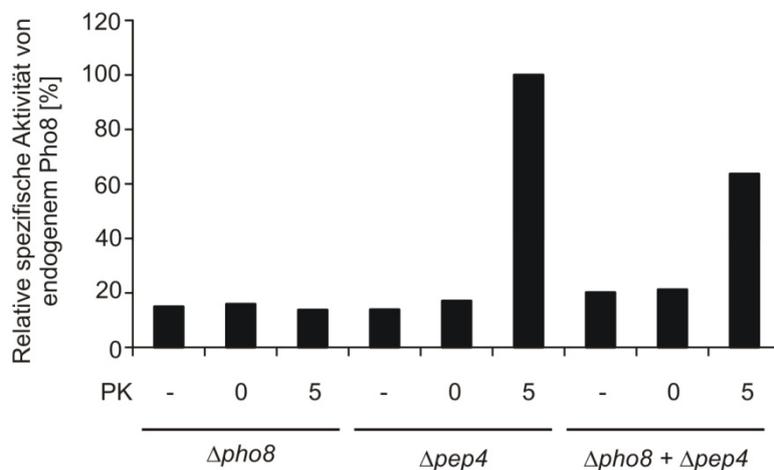


Abbildung 14: Die Aktivierung von endogenem Pho8 erfolgt nicht nachträglich *in vitro* während des Zellaufschlusses. $\Delta pho8$ und $\Delta pep4$ wurden in YPG-Medium kultiviert. In exponentieller Phase wurde ein Äquivalent von je vier OD₆₀₀ Zellen entweder separat oder als Gemisch beider Stämme mechanisch mittels Vortex aufgeschlüsselt. Die endogene Pho8-Aktivität wurde vor oder nach Aktivierung mit Proteinase K für 0-5 min enzymatisch bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen einem repräsentativen Experiment relativ zu Proteinase K-aktiviertem $\Delta pep4$ -Lysat.

3.1.3 Validierung des Zellaufschlusses mit dem Zellhomogenisator Precellys® 24

Um den Probendurchsatz zu erhöhen, wurde der Zellaufschluss mittels Vortex durch den Aufschluss mit dem Zellhomogenisator Precellys® 24 ersetzt. Dieser Zellhomogenisator schüttelt bis zu 24 Probengefäße in einer dreidimensionalen Bewegung, wodurch die mechanische Zerstörung der Zellwand mittels hochbeschleunigter Glaskugeln optimiert wird. Es muss jedoch beachtet werden, dass die starken Scherbewegungen bzw. die dadurch entstehende Wärmeentwicklung zur Inaktivierung der Phosphatase führen könnten. Die

Aufschlusszeit wurde deshalb minimiert und die Aufschlusseffizienz mittels Proteinkonzentration und Phosphatase-Aktivitäten der Aufschlussmethode mittels Vortex angeglichen. Tatsächlich war festzustellen, dass höhere Rotationsgeschwindigkeiten und längere Aufschlusszeiten die Menge an extrahiertem Gesamtprotein stark, die mtPho8-Aktivität jedoch nur unwesentlich erhöhten, was zu einem Verlust an Sensitivität bezogen auf die spezifische Aktivität führte (Tabelle 2). Ein optimales Verhältnis an funktionell extrahierter Phosphatase zu extrahiertem Gesamtprotein entsprechend des Aufschlusses mittels Vortex wurde mit einer Rotationszeit von 10 bis 15 Sekunden bei 5000 rpm erreicht. Entsprechend wurde für 10 und 15 Sekunden der Aktivitätsanstieg von mtPho8 nach Rapamycin-Behandlung im Vergleich zum Aufschluss mittels Vortex in einer dreifachen Bestimmung ermittelt. Der höchste Aktivitätsanstieg wurde mit einer Aufschlusszeit von 10 Sekunden erreicht (Abbildung 15).

Tabelle 2: Optimierung der Aufschlussparameter mit Precellys® 24

Rotationszeit [s]	Rotationsgeschwindigkeit [rpm]	Protein [mg/ml]	Pho8-Aktivität [nmol/min*ml]	spez. Pho8-Aktivität [mU/mg]
8	5000	0,41	138	337
10	5000	0,35	117	335
12	5000	0,40	135	338
15	5000	0,43	161	376
20	5000	0,60	165	273
10	6000	0,71	186	260
10	6500	0,56	145	262

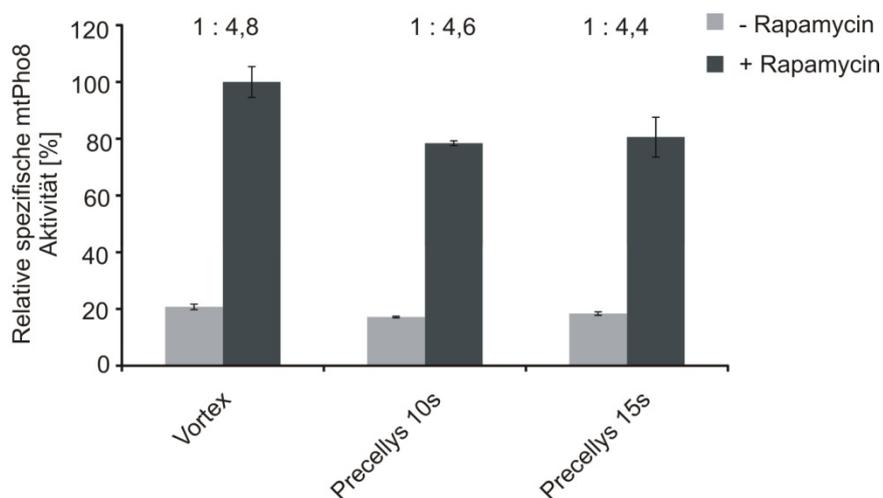


Abbildung 15: Optimierung des Zellaufschlusses mit Precellys® 24 Homogenisator. Ein Äquivalent von vier OD₆₀₀ Zellen vom Kontrollstamm (Δ pho8 + mtPho8) wurde während der exponentiellen Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 5h Rapamycin-Behandlung in SG-Medium geerntet und mechanisch mittels Vortex oder Precellys® 24 für 10 s oder 15 s aufgeschlossen. Anschließend wurde die mtPho8-Aktivität enzymatisch mittels ALP-Assay bestimmt und der relative Aktivitätsanstieg nach Rapamycin-Behandlung für die verschiedenen Aufschlussbedingungen verglichen. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten \pm s (n = 3), relativ zum Aufschluss mittels Vortex.

3.1.4 Der ALP-Assay ermöglicht die quantitative und vergleichbare Messung von Autophagie und Mitophagie

Mitophagie kann ebenso wie Autophagie durch Inhibierung des TOR-Kinase-Komplexes induziert werden. Die Inhibierung kann indirekt durch Stickstoffentzug oder chemisch durch Rapamycin direkt erfolgen. Im Folgenden wurden Stämme, die mtPho8 oder cytPho8 exprimierten, in glycerinhaltigem Selektivmedium (SG) kultiviert und einem Stickstoffentzug oder einer Behandlung mit Rapamycin unterzogen. Für mehrere Zeitpunkte wurden Proben entnommen und die spezifische ALP Aktivität bestimmt. Sowohl die mtPho8- als auch die cytPho8-Aktivität stieg im Kontrollstamm mit der Inkubationszeit an (Abbildung 16). In Δ pep4, dem Stamm, der keine Proteinase A für die Aktivierung von Pho8 in der Vakuole enthält, war kein Aktivitätsanstieg zu beobachten. Desweiteren blieb die Aktivität durch die noch enthaltene zytosolische alkalische Phosphatase Pho13 in einem sehr niedrigen Bereich und störte die Quantifizierung des Aktivitätsanstiegs durch Pho8 nicht. Das Lösungsmittel der Rapamycin-Stammlösung, Dimethylsulfoxid (DMSO), hatte keinen Einfluss auf die Phosphatase-Aktivität. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung von mtPho8 und cytPho8 spezifisch in der Vakuole durch Proteinase A erfolgt und ein Maß für Mitophagie bzw. Autophagie ist.

Interessanterweise wurde Mitophagie durch Rapamycin stärker induziert als durch Stickstoffentzug, während für die Autophagie kein Unterschied bestand. Möglicherweise wird Mitophagie anders reguliert als Autophagie. Im Folgenden wurden die Regulationsmechanismen für Mitophagie genauer untersucht.

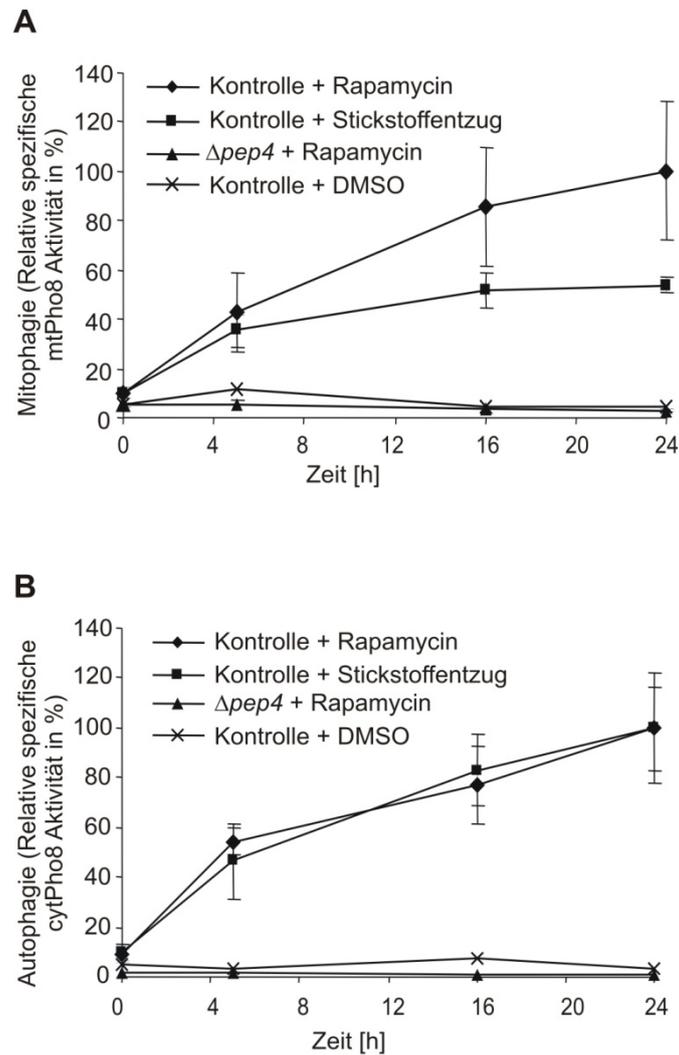


Abbildung 16. Der ALP-Assay ist geeignet für die Quantifizierung von Mitophagie und Autophagie. A-B Angegebene Stämme wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytoPho8 (B) mit DMSO, Rapamycin oder in Stickstoff-freiem Medium für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Kontrolle entspricht $\Delta pho8$. Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytoPho8-Aktivität bestimmt. Der Aktivitätsanstieg ist abhängig von Proteinase A (PEP4), was die Aktivierung in der Vakuole bestätigt. Die Messreihen mit DMSO entsprechen einem repräsentativen Ergebnis. Alle anderen Messreihen entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n = 3$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung.

3.2 Die Abhängigkeit der Mitophagie von bekannten Faktoren der Autophagie

3.2.1 Die Rapamycin-induzierte Mitophagie ist eine selektive Form der Autophagie. Mitophagie ist im engeren Sinn die Bezeichnung für den selektiven Abbau von Mitochondrien über Autophagie. Um zu prüfen, ob es sich bei dem Anstieg der mtPho8-Aktivität nach Rapamycin-Behandlung um selektive Mitophagie handelt, wurde die Abhängigkeit von bekannten Faktoren für selektive Formen von Autophagie untersucht. Dazu wurden Stämme für den ALP-Assay generiert, in denen jeweils ein essenzielles Gen für selektive oder alle Formen von Autophagie deletiert war. Die Stämme wurden in SG-Medium kultiviert und für 24 Stunden mit Rapamycin behandelt. In $\Delta atg11$, einem Stamm, der nicht funktionell für selektive Formen von Autophagie ist, war die Mitophagie vollständig inhibiert, während die Autophagie nur unwesentlich betroffen war (Abbildung 17). In Mutanten, in denen entweder *ATG20* oder *ATG24* deletiert war, wurde eine Reduktion der Mitophagie um ca. 40% beobachtet, was konsistent mit bereits publizierten Daten für einen partiellen Effekt von Atg20 und Atg24 auf selektive Autophagie ist. Weder Mitophagie noch Autophagie wurde ohne den essenziellen Autophagie-Faktor Atg8 induziert.

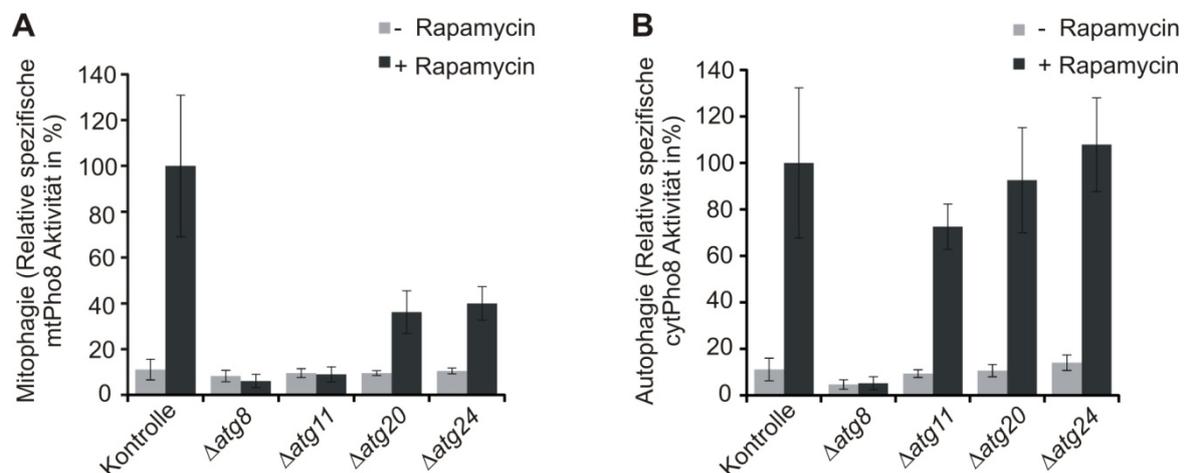


Abbildung 17: Rapamycin-induzierte Mitophagie hängt von bekannten Faktoren für selektive Autophagie ab. A-B Angegebene Deletionsstämme wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytoPho8 (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytoPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten \pm s ($n \geq 4$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung.

Um diese Ergebnisse weiter abzusichern, wurden die Zellysate mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die Prozessierung von mtPho8 und cytPho8 entsprach der gemessenen Phosphatase-Aktivität in den einzelnen Stämmen (Abbildung 18). Weiterhin wurden die Mengen verschiedener mitochondrialer Proteine überprüft. Die Behandlung mit Rapamycin führte zu einem Abbau von Tim23, MPP, Mgm1 und Aac2 im Kontrollstamm, jedoch nicht in $\Delta atg11$ und $\Delta atg8$, also Stämmen, in denen Mitophagie inhibiert ist. Speziell die konstante Menge an mitochondrialen Proteinen in $\Delta atg11$ zeigt, dass der Abbau spezifisch über selektive Mitophagie erfolgt. In $\Delta atg20$ und $\Delta atg24$ war der Abbau vergleichbar mit dem Kontrollstamm. Dieses Ergebnis ist konform mit der partiell stattfindenden Mitophagie in diesen Stämmen. Der partielle Effekt auf Mitophagie ist vermutlich zu schwach, um ihn über den mitochondrialen Proteingehalt mittels Westernblot detektieren zu können.

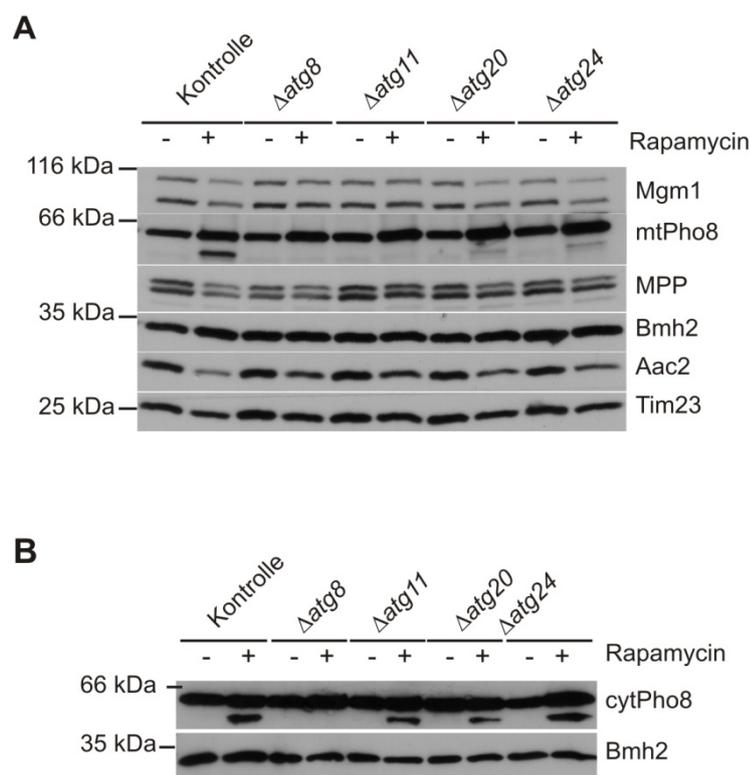
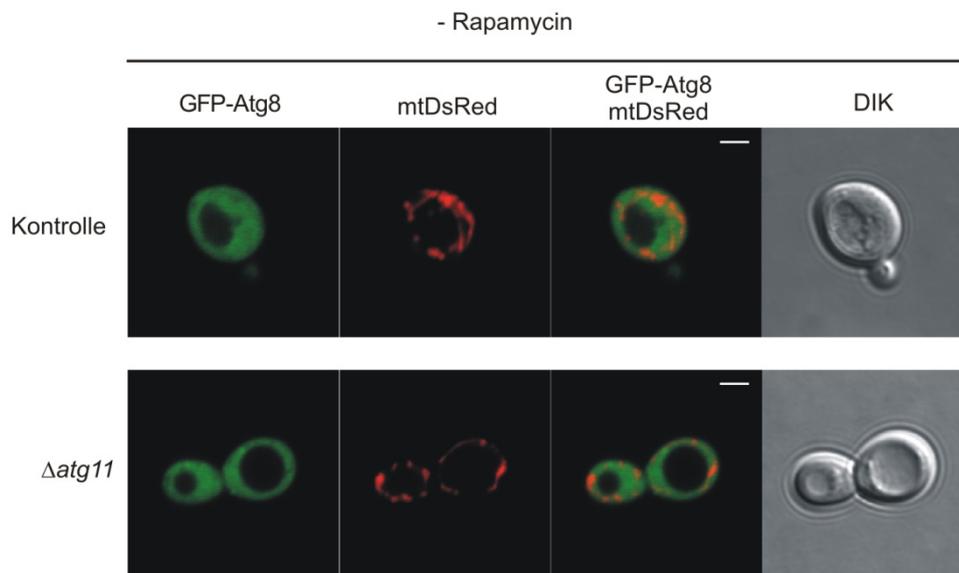


Abbildung 18: Mitophagie führt zum selektiven Abbau mitochondrialer Proteine. A-B Angegebene Deletionsstämmen wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytPho8 (B) in SG-Medium kultiviert. Zellysate wurden aus exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den Gehalt mitochondrialer Proteine sowie mtPho8-Prozessierung (A) oder cytPho8-Prozessierung (B) analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$.

Um abzusichern, dass die biochemisch gewonnenen Daten den biologischen Prozess des Transports der Mitochondrien in die Vakuolen widerspiegeln, wurden zusätzlich mikroskopische Studien durchgeführt. Dazu wurden Zellen, die mitochondrial lokalisiertes DsRed und GFP-Atg8 exprimierten, nach Rapamycin-Behandlung mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Diese Technik ermöglicht Kollokalisierungsstudien in einer Ebene der Zelle. GFP-Atg8 befindet sich in proliferierenden Zellen gleichmäßig verteilt im Zytoplasma und wird während der Autophagie in der Vakuole akkumuliert. Gleichzeitig kommt es durch Mitophagie zu einer Anreicherung des mitochondrialen DsRed in der Vakuole. Über Kollokalisierung von mtDsRed und GFP-Atg8 lässt sich somit Mitophagie nachweisen. Nach Behandlung mit Rapamycin für 7,5 Stunden wurde im Kontrollstamm für 10% der Zellen eine Kollokalisierung festgestellt. In $\Delta atg11$ wurde jedoch ausschließlich GFP-Atg8 in der Vakuole akkumuliert (Abbildung 19). Demnach ist Rapamycin-induzierte Mitophagie auch basierend auf der mikroskopisch-visuellen Analyse abhängig von Atg11. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Rapamycin die Mitophagie als selektive Form der Autophagie induziert und dass der etablierte ALP-Assay eine verlässliche und sensitive Quantifizierung von Autophagie und Mitophagie in *S. cerevisiae* ermöglicht.



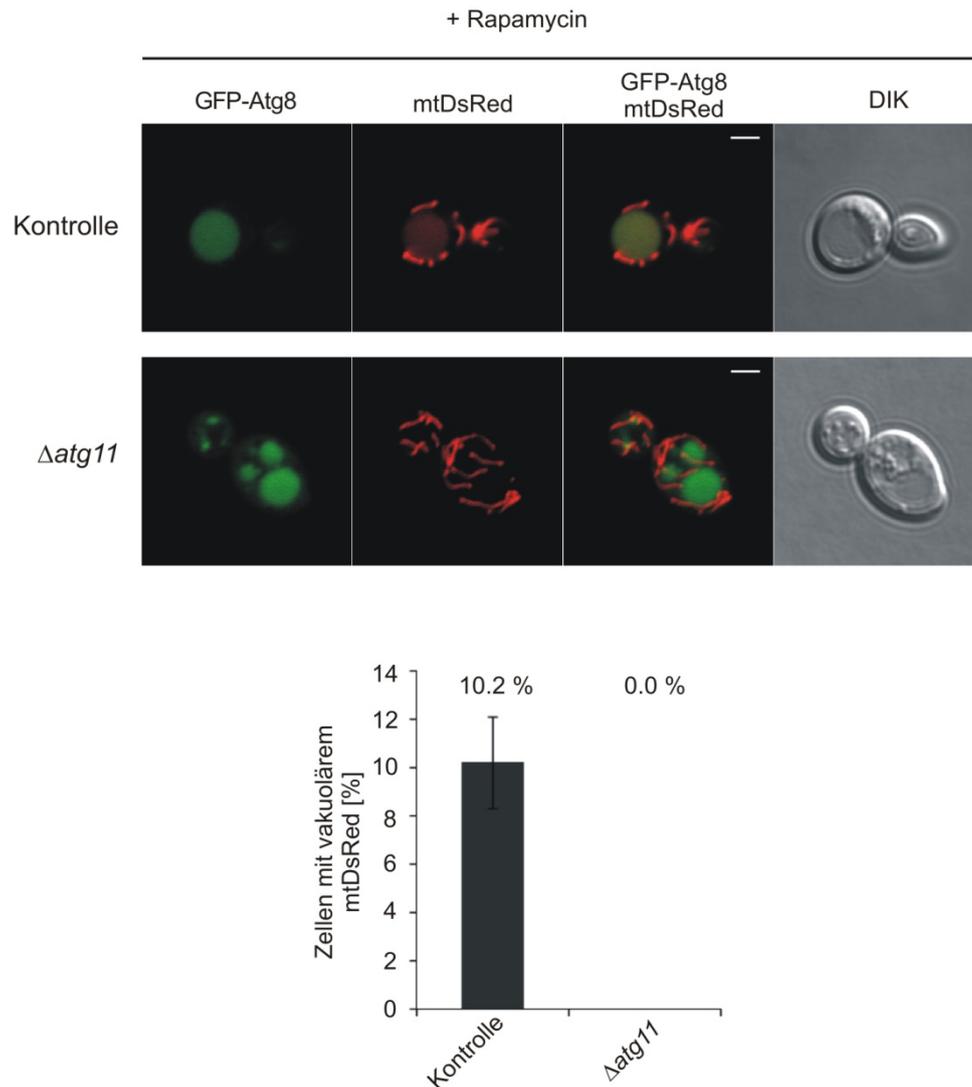


Abbildung 19: Die Akkumulation des mitochondrialen Fluoreszenzmarkers DsRed in der Vakuole ist in $\Delta atg11$ inhibiert. Wildtyp (Kontrolle) und $\Delta atg11$ wurden unter Expression von mtDsRed und GFP-Atg8 in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase mit DMSO (- Rapamycin) oder Rapamycin für 7,5 h behandelt und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert, Skalierung $2\mu\text{m}$ (DIK – Differentialinterferenzkontrast). Zellen mit vakuolär akkumuliertem mtDsRed wurden ausgezählt und der Prozentsatz zur Gesamtzellzahl angegeben. Die Ergebnisse der Auszählung entsprechen Mittelwerten $\pm s$ ($n \geq 3$). Die Durchführung und das Erstellen der Bilder wurden von Angelo Occhipinti ausgeführt.

3.2.2 Mitophagie ist nicht abhängig von Uth1 oder Aup1

Zu Beginn dieser Arbeit wurden in der Literatur zwei weitere Proteine als Faktoren für Mitophagie diskutiert. Dabei handelt es sich um Uth1, ein Protein, das an der Zellwandbiogenese und an Alterungsprozessen beteiligt ist, und Aup1, eine mitochondriale Phosphatase. Um den Einfluss dieser Proteine auf Mitophagie zu untersuchen, wurden die entsprechenden Deletionsstämme in SG-Medium kultiviert und für verschiedene Zeitpunkte

mit Rapamycin behandelt. Mitophagie wurde in beiden Deletionsstämmen ähnlich stark induziert wie im Kontrollstamm (Abbildung 20). Das weist darauf hin, dass weder Uth1 noch Aup1 für Mitophagie essenziell sind. Entsprechend wurden diese Proteine nicht weiter auf ihre Funktion in Mitophagie untersucht.

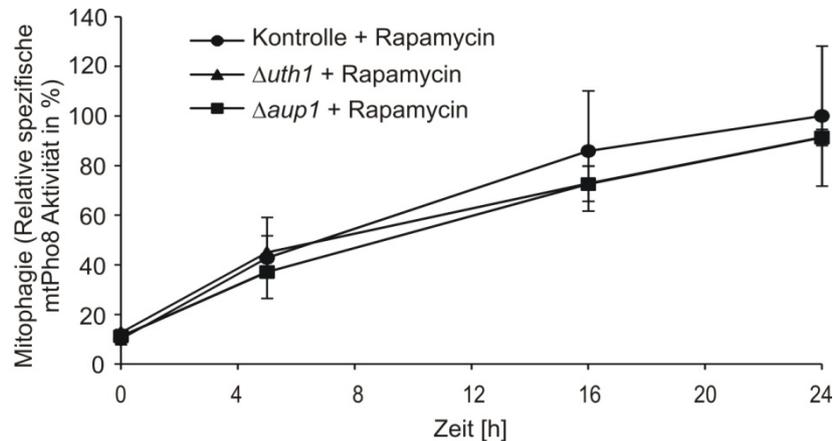


Abbildung 20: Die Mitophagie ist in Δ uth1 und Δ aup1 nicht beeinträchtigt. Δ uth1 und Δ aup1 wurden unter Expression von mtPho8 in SG-Medium kultiviert, in exponentieller Wachstumsphase für angegebene Zeiträume mit Rapamycin behandelt und mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht Δ pho8. Die Ergebnisse für den Kontrollstamm und Δ uth1 entsprechen den Mittelwerten \pm s (n = 3), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung. Ergebnisse für Δ aup1 entsprechen einer Messreihe mit vergleichbarer mtPho8 Expression.

3.3 Der Zusammenhang zwischen Mitophagie und mitochondrialer Morphologie

3.3.1 Mitophagie resultiert nicht in mitochondrialer Fragmentierung

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen mitochondrialer Morphologie und Mitophagie genauer untersucht. Zunächst stellte sich die Frage, ob Mitochondrien während der Induktion von Mitophagie durch Rapamycin fragmentieren. Dazu wurde die mitochondriale Morphologie während der Induktion von Mitophagie mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zellen, welche mitochondrial lokalisiertes GFP exprimierten, wurden in SG-Medium kultiviert, für 30 Minuten oder zwei Stunden mit Rapamycin behandelt, chemisch fixiert und in einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Mitochondrien behielten sowohl nach 30 Minuten als auch nach 2 Stunden eine deutlich tubuläre Struktur und wiesen keinerlei Fragmentierung auf (Abbildung 21). Auch nach

längeren Inkubationszeiten bis 24 Stunden wurde keine Veränderung der Morphologie beobachtet (nicht gezeigt). Demnach geht Mitophagie nicht mit einer Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes einher. Weiterhin lässt sich ableiten, dass nur ein Teil der Mitochondrien durch Mitophagie abgebaut wurde, da sich die Menge an Mitochondrien vor und nach Behandlung mit Rapamycin nicht merklich unterschied.

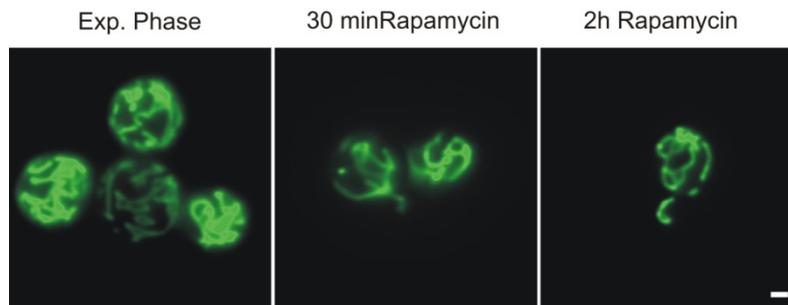


Abbildung 21: Während der Mitophagie bleibt die tubuläre mitochondriale Morphologie erhalten. Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) wurde unter Expression von mtGFP in SG-Medium kultiviert und jeweils vor (-Rapamycin) oder nach Inkubation mit Rapamycin für 30 min oder 2 h mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die mitochondriale Morphologie analysiert. Die Bilder sind repräsentativ für 98% der Zellen ($n > 500$), Skalierung 1 μm .

3.3.2 Mitophagie wird nicht durch Fragmentierung von Mitochondrien induziert

Weiterhin wurde untersucht, ob mitochondriale Fragmentierung ausreichend für die Induktion von Mitophagie ist. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe eines temperatursensitiven *mgm1-5* Stamms adressiert. Dieser Stamm enthält eine Punktmutation in der GTPase-Domäne von Mgm1, was zu gestörter Membranfusion bei erhöhten Temperaturen führt (Wong et al., 2000). Als Konsequenz der weiter ablaufenden Teilungsprozesse kommt es damit zur Fragmentierung der mitochondrialen Struktur in diesem Stamm bei 37°C. Fluoreszenzmikroskopie von *mgm1-5* und dem korrespondierenden Wildtyp zeigte in beiden Stämmen eine normale, tubuläre mitochondriale Struktur bei 24°C (Abbildung 22). Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C führte in *mgm1-5* bereits nach zwei Stunden zu Fragmentierung und nach längerer Inkubationszeit zu Aggregation, was den für diesen Stamm publizierten Daten entspricht. Der Wildtyp zeigte auch bei längerer Inkubation bei 37°C eine typische tubuläre Morphologie.

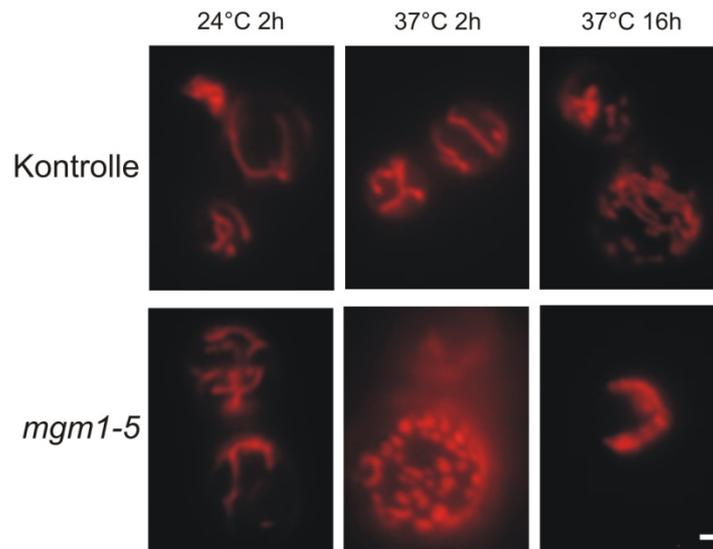


Abbildung 22: Erhöhte Temperatur führt in *mgm1-5* zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks. Wildtyp (Kontrolle) und *mgm1-5* wurden unter Expression von mtDsRed bei 24°C oder 37°C für angegebene Zeiträume in SG-Medium inkubiert und die mitochondriale Morphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Skalierung 1 µm.

Im Folgenden wurde *mgm1-5* und der korrespondierende Wildtyp für verschiedene Zeiten in SG-Medium bei 37°C inkubiert und Mitophagie mittels ALP-Assay bestimmt. Da in vorherigen Versuchen mit Rapamycin frühestens nach fünf Stunden ein signifikanter Anstieg der mtPho8 Aktivität in Folge von Mitophagie zu beobachten war, wurde erstmals nach dieser Zeit auf Mitophagie untersucht. Jedoch war nach fünf Stunden kein signifikanter Anstieg der mtPho8-Aktivität messbar. Auch nach einer längeren Inkubationszeit von neun Stunden bei 37°C konnte keine Induktion der Mitophagie detektiert werden (Abbildung 23). Demzufolge wird durch Fragmentierung allein keine Mitophagie in messbarem Ausmaß induziert.

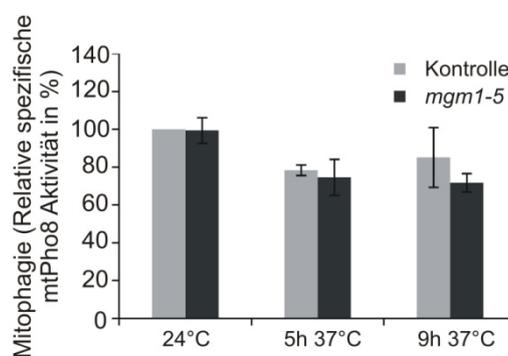


Abbildung 23: Mitochondriale Fragmentierung ist kein hinreichender Auslöser von Mitophagie. Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) und *mgm1-5* wurden unter Expression von mtPho8 bei 24°C in SG-Medium kultiviert und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Mitophagie wurde mittels ALP-Assay über die mtPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n = 3$), relativ zur Kontrolle bei 24°C.

Es wäre möglich, dass mitochondriale Fragmente erst nach einer längeren Zeit durch Mitophagie abgebaut werden. Zusätzlich könnte der Zustand der Fragmentierung über eine längere Zeit die Anhäufung von Fehlfunktionen der Mitochondrien begünstigen und die Menge der zum Abbau markierten Fragmente erhöhen. Daher wurden in einem weiteren Experiment Kulturen von *mgm1-5* oder Wildtyp für längere Zeitpunkte bei 37°C hitzeschock-behandelt und anschließend wieder bei 24°C inkubiert, um die mitochondriale Morphologie zu regenerieren. Nach fünf Stunden Regenerationszeit wurden die Kulturen wiederum auf Mitophagie mittels ALP-Assay untersucht. Jedoch wurde auch in diesem Fall kein Anstieg der mtPho8-Aktivität gemessen (Abbildung 24). Mitochondriale Fragmentierung allein scheint damit kein Auslöser für Mitophagie in Bäckerhefe zu sein. Weiterhin wurde die Induktion von Mitophagie nach Behandlung der Hefezellen mit chemischen Substanzen untersucht, welche das Membranpotenzial depletieren oder eine mitochondriale Dysfunktion verursachen. Zur Depletion des Membranpotenzials wurde Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und Valinomycin in Konzentration von 0,1 μM bis 10 μM eingesetzt. Der Verlust des Membranpotenzials inhibiert in Bäckerhefe die mitochondriale Fusion und die Bildung von ATP, was einer mitochondrialen Dysfunktion entspricht. Dadurch kommt es über einen längeren Zeitraum zur Fragmentierung der Mitochondrien. Weder durch die Behandlung mit CCCP noch mit Valinomycin konnte eine Induktion der Mitophagie induziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von Antimycin, welches den Komplex III der Atmungskette hemmt, oder Oligomycin, welches die Produktion von ATP durch Inhibierung der ATPase hemmt, führte in Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM zur Fragmentierung der Mitochondrien, jedoch ebenfalls nicht zur Induktion von Mitophagie (Daten nicht gezeigt). Es läßt sich nicht abschätzen, inwiefern diese Behandlungen die physiologische Entstehung dysfunktioneller Mitochondrien simulieren können. Diese Ergebnisse liefern daher noch keine Hinweise, ob Mitophagie in Bäckerhefe durch mitochondriale Dysfunktion induziert wird.

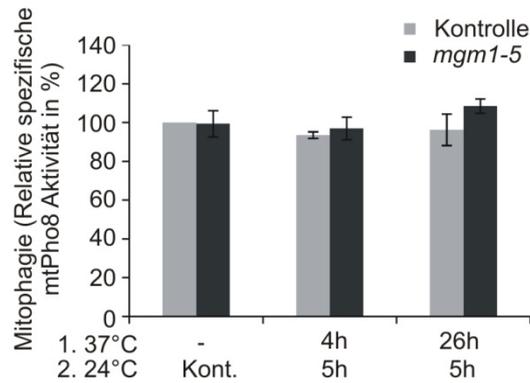


Abbildung 24: Die Regeneration der tubulären Morphologie führt nicht zu einem Anstieg der Mitophagie. Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) und *mgm1-5* wurden unter Expression von mtPho8 für die angegebenen Zeitpunkte bei 24°C oder 37°C in SG-Medium inkubiert und anschließend für 5 h bei 24°C inkubiert, um die mitochondriale Morphologie zu regenerieren. Danach wurde Mitophagie mittels ALP-Assay über die mtPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ (n = 3), relativ zur Kontrolle bei 24°C.

Um sicherzustellen, dass die Mitophagie in *mgm1-5* durch Inhibierung der Fusion bei 37°C nicht verhindert wird, wurde zur Kontrolle Mitophagie mit Rapamycin induziert. Dazu wurden *mgm1-5* und der korrespondierende Wildtyp zunächst in SG-Medium bei 24°C kultiviert und anschließend für fünf Stunden mit Rapamycin sowohl bei 24°C als auch bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Kulturen geerntet und Mitophagie mittels ALP-Assay bestimmt. Sowohl bei 24°C als auch bei 37°C war für beide Stämme ein signifikanter Anstieg der mtPho8-Aktivität zu beobachten (Abbildung 25). Demnach wird Mitophagie durch die Verhinderung der mitochondrialen Fusion prinzipiell nicht inhibiert. Hervorzuheben ist, dass die Mitophagie bei 37°C für *mgm1-5* stark schwankte, was sich in der hohen Standardabweichung widerspiegelt. Diese Schwankungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die mitochondriale Morphologie einen Einfluss auf das Ausmaß der Rapamycin-induzierten Mitophagie hat. Obwohl die Daten keine Schlussfolgerung zulassen, ob die Rapamycin-induzierte Mitophagie durch Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes positiv oder negativ beeinflusst wird, geht daraus hervor, dass die Fusion nicht für die Mitophagie benötigt wird.

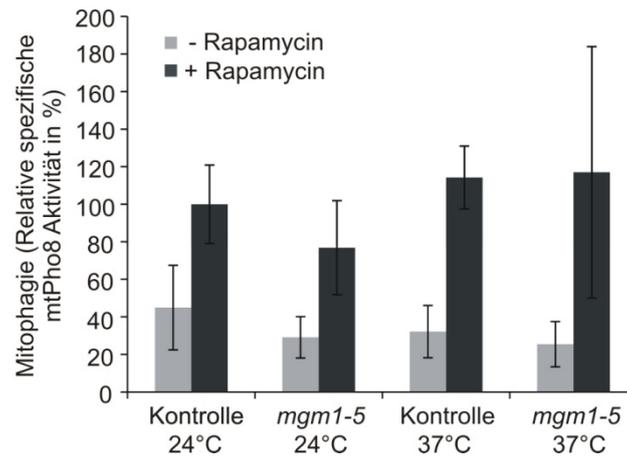


Abbildung 25: Mitophagie ist nicht abhängig von mitochondrialer Fusion. Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) und *mgm1-5* wurden unter Expression von mtPho8 bei 24°C in SG-Medium kultiviert. Die Mitophagie wurde in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 5 h Rapamycin-Behandlung bei 24°C oder 37°C mittels ALP-Assay über die mtPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ (n = 3), relativ zur Kontrolle nach 5h Rapamycin-Behandlung bei 24°C.

3.3.3 Mitophagie ist unabhängig von der mitochondrialen Teilungsmaschinerie

Mitophagie erfolgt über den Einschluß von Mitochondrien in Autophagosomen oder direkt in der Vakuole. Jedoch wird immer nur ein Teil der Mitochondrien abgebaut. Daher stellt sich die Frage, wie dieser Anteil selektiert wird und ob die mitochondriale Teilung für diesen Vorgang notwendig ist. Dazu wurden Stämme, in welchen die mitochondriale Teilung durch Expression von dominant-negativen Varianten von Dnm1 inhibiert ist (Otsuga et al., 1998), für 24 Stunden mit Rapamycin in SG-Medium behandelt, um Mitophagie und Autophagie zu induzieren. Interessanterweise war der Anstieg der mtPho8-Aktivität im Stamm, welcher Dnm1^{WT} enthielt etwas geringer als in den Stämmen, welche Dnm1^{K41A}, Dnm1^{S42N} oder den leeren Vektor enthielten (Abbildung 26). Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant und könnten möglicherweise auf geringe Unterschiede in der mtPho8-Expression zurückzuführen sein. Die cytPho8-Aktivität stieg nach Rapamycin-Behandlung in allen Stämmen ähnlich stark an. Entsprechend ist weder Mitophagie noch Autophagie durch die Expression von dominant-negativem Dnm1 betroffen und damit unabhängig von der Dnm1-abhängigen mitochondrialen Teilung.

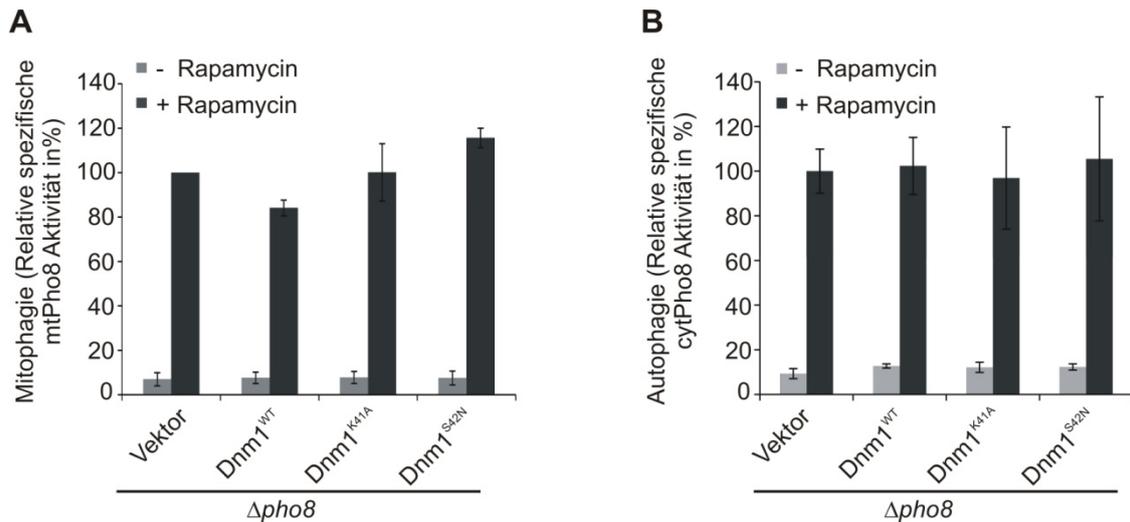


Abbildung 26: Inhibierung der Dnm1-abhängigen mitochondrialen Teilung zeigt keinen Einfluss auf Mitophagie. A-B $\Delta pho8$ wurde unter Expression von Wildtyp- oder dominant-negativem Dnm1 und mtPho8 (A) oder cytPho8 (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ (n = 3), relativ zur Kontrolle nach 24h Rapamycin-Behandlung.

Die Analyse mittels SDS-PAGE und Westernblot zeigte, dass die Prozessierung von mtPho8 und cytPho8 in allen Stämme ähnlich stark ausgeprägt war. Der Abbau von mitochondrialen Proteinen war in Einklang damit vergleichbar für alle Stämme (Abbildung 27). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Inhibierung der Dnm1-abhängigen mitochondrialen Teilung die Mitophagie nicht beeinflusst.

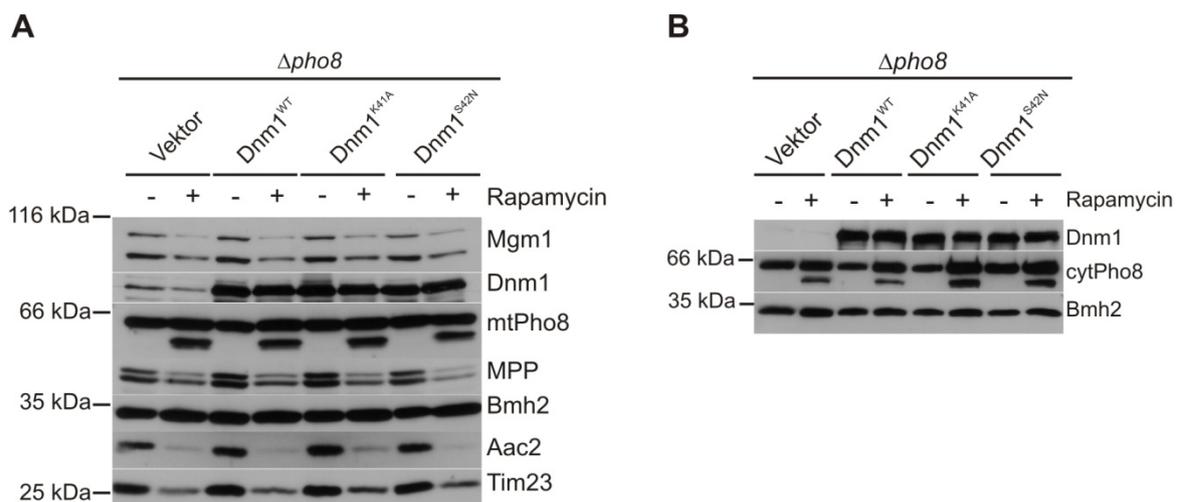


Abbildung 27: Der Abbau von mitochondrialen Proteinen durch Mitophagie ist durch Expression von dominant-negativem Dnm1 nicht inhibiert. A-B $\Delta pho8$ wurde unter Expression von Wildtyp- oder dominant-negativem Dnm1 und mtPho8 (A) oder cytPho8 (B) in SG-Medium kultiviert. Zellextrakte wurden aus exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24h Rapamycin-Behandlung mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den Gehalt mitochondrialer Proteine sowie mtPho8-Prozessierung (A) oder cytPho8-Prozessierung (B) analysiert.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass trotz der Expression von dominant-negativem Dnm1 noch minimale Teilungsaktivität besteht, welche ausreicht, um Mitochondrien in Autophagosomen oder der vakuolären Membran einzuschließen. Desweiteren könnten andere Faktoren der mitochondrialen Teilung notwendig für Mitophagie sein, z.B. bei der Abschnürung von mitochondrialen Fragmenten. Daher wurden zur weiteren Absicherung des Ergebnisses Deletionsmutanten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie untersucht. Die korrekte Lokalisation von mtPho8 in den Deletionsstämmen wurde mittels Zellfraktionierung und SDS-PAGE und Westernblot bestätigt (Abbildung 28).

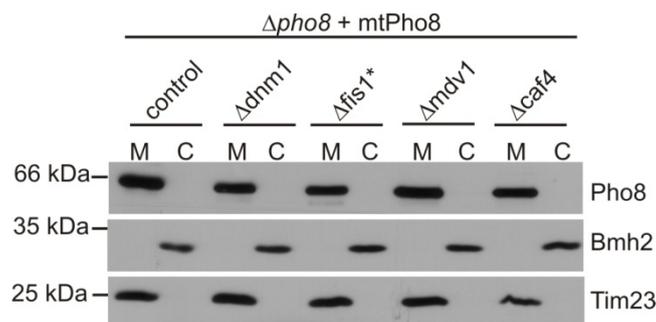


Abbildung 28: In Deletionsstämmen von Faktoren der mitochondrialen Teilungsmaschinerie ist mtPho8 richtig lokalisiert. Mitochondrien (M) und Zytosol (C) wurden über Differentialzentrifugation aus Zellextrakten der angegebenen Stämme separiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot auf korrekte mtPho8-Lokalisation analysiert.

Kulturen der jeweiligen Deletionsstämmen wurden in SG-Medium kultiviert, für 24 Stunden mit Rapamycin behandelt und sowohl das Ausmaß der Mitophagie als auch der Autophagie quantifiziert (Abbildung 29A-B). Dabei zeigte sich, dass Mitophagie auch in $\Delta dnm1$ nicht inhibiert ist. Das gleiche Ergebnis wurde für $\Delta mdv1$ und für $\Delta caf4$ erhalten. Demnach ist die mitochondriale Teilung für Mitophagie nicht essenziell. Interessanterweise waren jedoch in einem $fis1^*$ -Deletionsstamm Mitophagie um 50% und Autophagie um 30% reduziert. Diese Ergebnisse wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot (Abbildung 29C-D) und Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 30) bestätigt.

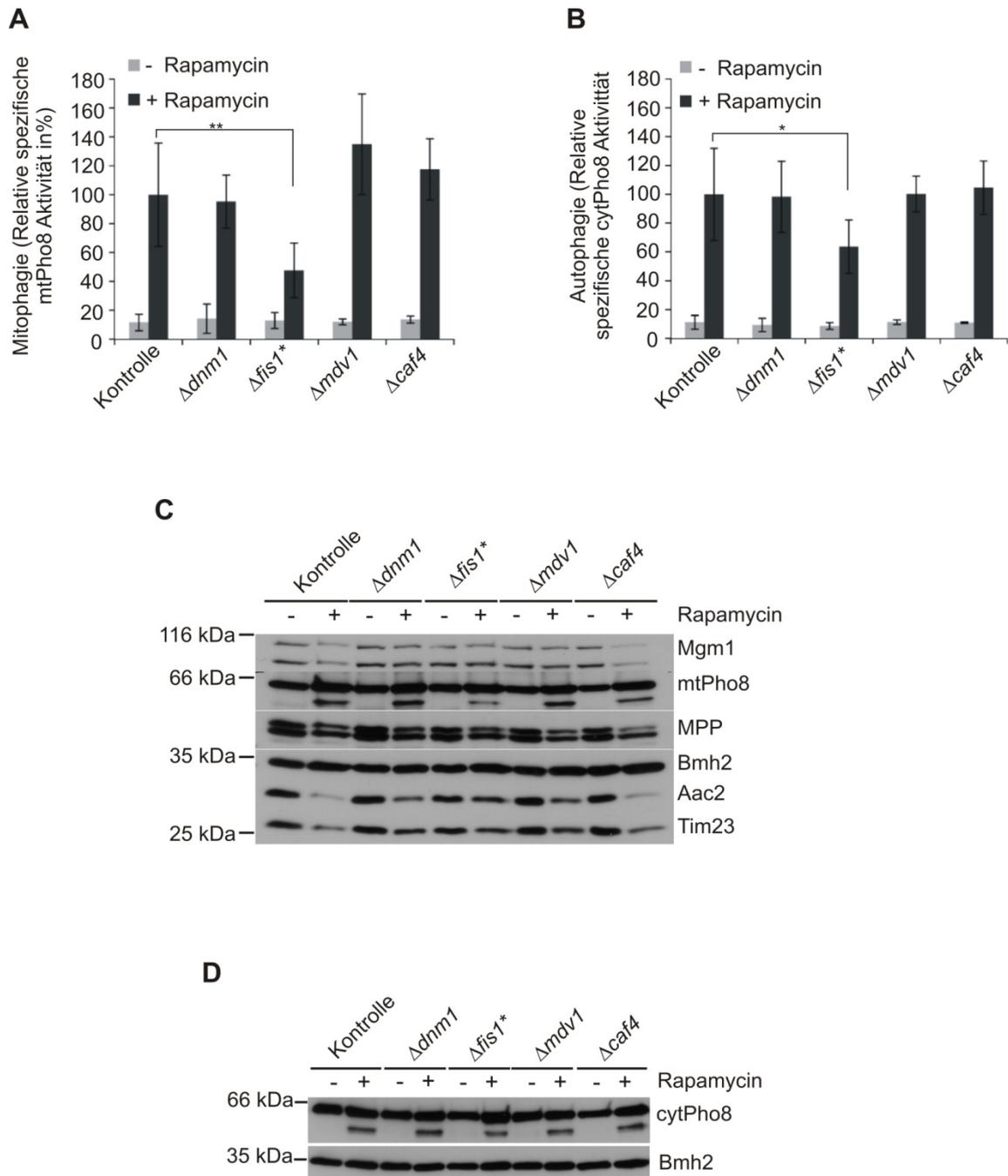
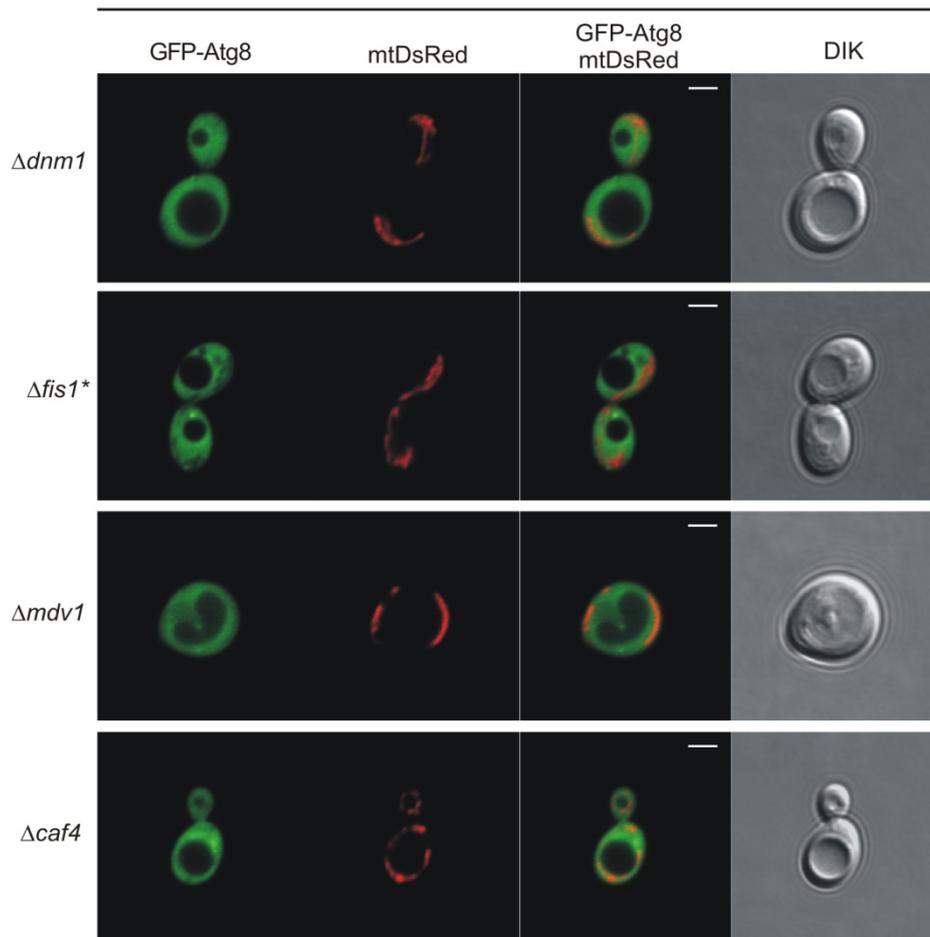
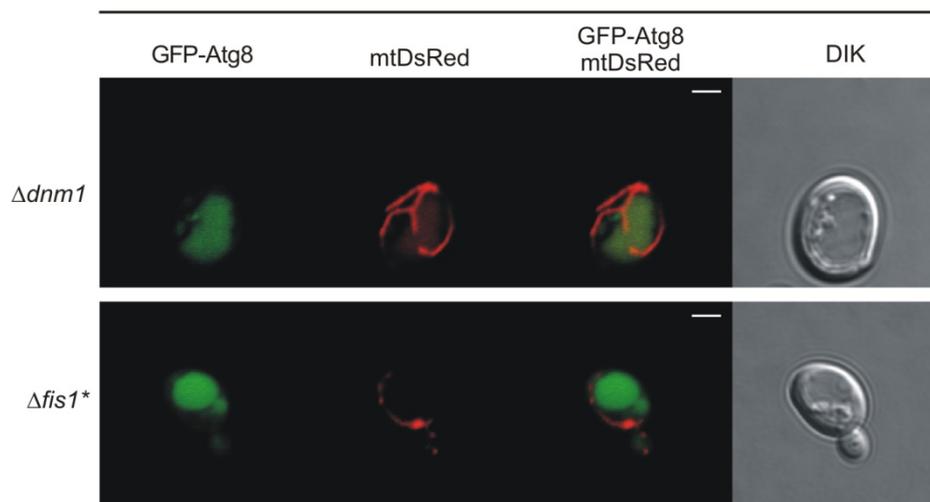


Abbildung 29: Mitophagie und Autophagie ist reduziert in $\Delta fis1^*$, wird jedoch durch die Inhibierung mitochondrialer Teilung generell nicht beeinflusst. A-D Angegebene Stämme wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytoPho8 (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. $\Delta fis1^*$ entspricht dem Stamm mit einer Suppressor-Mutation. **A-B** Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytoPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n \geq 4$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung, signifikant mit ****** $p < 0.001$ und ***** $p < 0.005$. **C-D** Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den Gehalt mitochondrialer Proteine sowie mtPho8-Prozessierung (C) oder cytoPho8-Prozessierung (D) analysiert.

- Rapamycin



+ Rapamycin



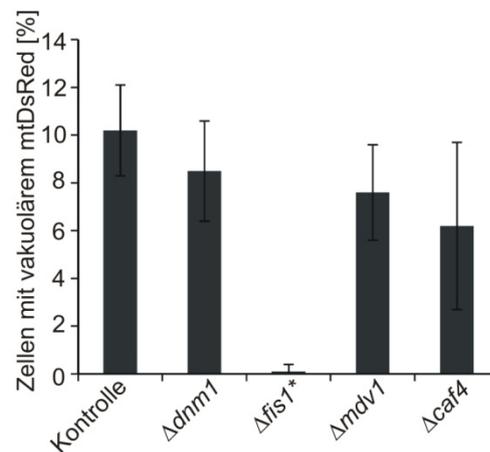
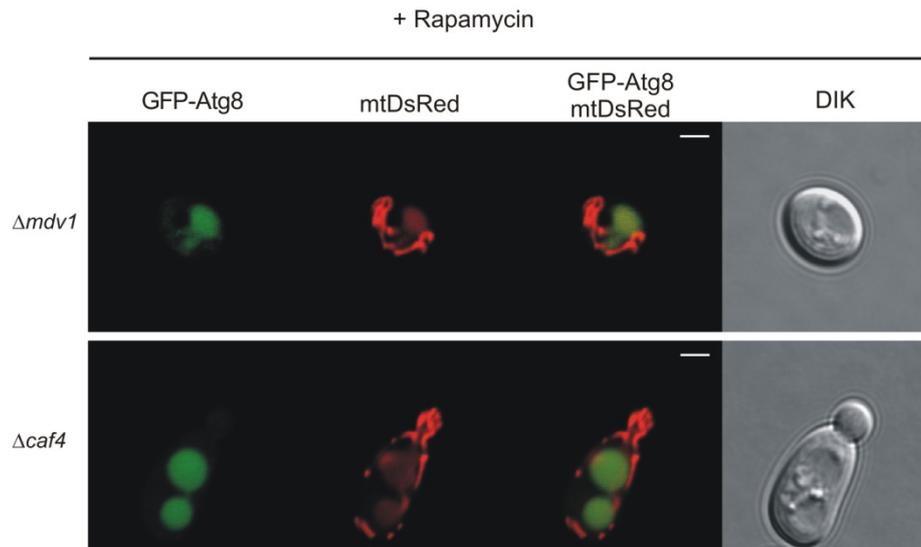


Abbildung 30: Akkumulation von mitochondrialem Fluoreszenzmarker DsRed in der Vakuole ist inhibiert in $\Delta fis1^*$, jedoch vergleichbar mit Wildtyp in allen anderen Deletionsmutanten der mitochondrialen Teilung. Die angegebenen Stämme wurden unter Expression von mtDsRed und GFP-Atg8 in SG-Medium kultiviert, in exponentieller Wachstumsphase mit DMSO (- Rapamycin) oder Rapamycin für 7,5 h behandelt und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert, Skalierung 2 μm , (DIK – Differentialinterferenzkontrast). Zellen mit vakuolär akkumuliertem mtDsRed wurden ausgezählt und der Prozentsatz zur Gesamtzellzahl angegeben. Die Ergebnisse der Auszählung entsprechen Mittelwerten \pm s ($n \geq 3$). $\Delta fis1^*$ entspricht dem Stamm mit einer Suppressor-Mutation. Die Durchführung und das Erstellen der Bilder wurden von Angelo Occhipinti ausgeführt.

Zusätzlich wurde Mitophagie in Deletionsstämmen der Teilungsmaschinerie durch Stickstoffentzug untersucht. Dazu wurden die Stämme in SG-Medium angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase in ein stickstofffreies Medium überführt, das entweder Glukose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle enthielt. Nach 24 Stunden wurden die

Kulturen geerntet und die mtPho8-Aktivitäten im Vergleich zu unbehandelten Kulturen bestimmt. Die mtPho8-Aktivität stieg nach 24 Stunden Stickstoffentzug sowohl im Kontrollstamm als auch in den Deletionsstämmen $\Delta dnm1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$ deutlich an (Abbildung 31). Die Kohlenstoffquelle im stickstofffreien Medium hatte dabei wenig Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Mitophagie. Die Induktion der Mitophagie durch Stickstoffentzug war jedoch auch in diesen Stämmen deutlich geringer als durch Rapamycin. Im $\Delta fis1^*$ -Stamm wurde unter diesen Bedingungen kein Anstieg der mtPho8 Aktivität beobachtet. Weiterhin war der Anstieg der mtPho8-Aktivität in $\Delta dnm1$ und $\Delta caf4$ geringer als in der Kontrolle. Die Schwankungsbreite des Aktivitätsanstiegs war jedoch in diesem Experiment so hoch, dass die Unterschiede nicht signifikant waren. Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass die Induktion der Mitophagie in $\Delta dnm1$ und $\Delta caf4$ durch Stickstoffentzug reduziert ist. Desweiteren war unter diesen Bedingungen die Mitophagie im $\Delta fis1^*$ Stamm inhibiert. Insgesamt deuten auch diese Ergebnisse an, dass die Maschinerie der mitochondrialen Teilung keine Grundvoraussetzung für Mitophagie ist.

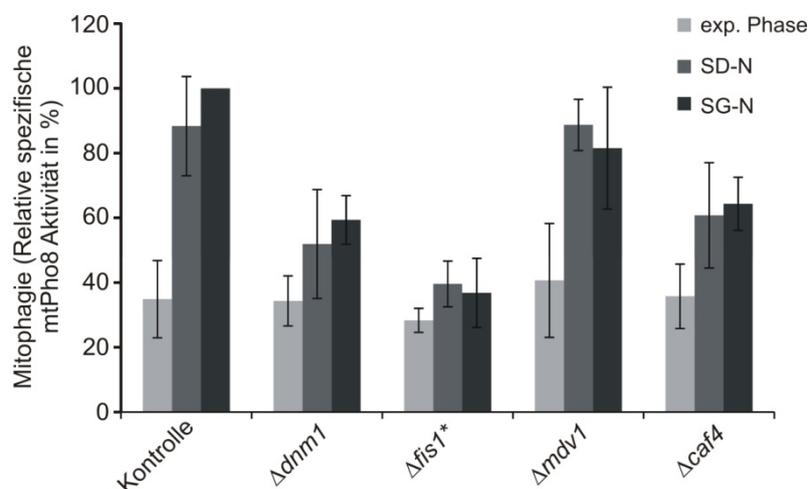


Abbildung 31: Die mitochondriale Teilung ist für Mitophagie induziert durch Stickstoffentzug nicht essenziell, jedoch inhibiert in $\Delta fis1^*$. Angegebene Stämme wurden unter Expression von mtPho8 in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (exp. Phase) oder nach Inkubation in stickstofffreiem Medium supplementiert mit Glukose (SD-N) oder Glycerin (SG-N) nach 24 h mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. $\Delta fis1^*$ entspricht dem Stamm mit einer Suppressor-Mutation. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n = 3$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Inkubation in SG-N.

Es ist fraglich, wie der Effekt von Fis1 auf die Mitophagie im Gegensatz zu den anderen Faktoren der Teilungsmaschinerie erklärt werden könnte. Etwa zur Zeit dieser Studie wurde in der Literatur eine Punktmutation im kodierenden Bereich für *WHISKEY2* (*WHI2*) in *fis1*-Deletionsstämmen der Euroscarf-Stammsammlung beschrieben (Cheng et al., 2008). Der Stamm ist demzufolge mit $\Delta fis1^*$ bezeichnet. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Reduktion der Mitophagie und Autophagie auf die Abwesenheit von Fis1 oder auf eine Mutation in *WHI2* zurückzuführen ist.

3.4 Effekt der *fis1*-Deletion auf Mitophagie ist bedingt durch eine sekundäre Mutation in *WHISKEY2*

3.4.1 $\Delta fis1^*$ weist eine Mutation in *WHISKEY2* auf

Der Deletionsstamm $\Delta fis1^*$ von Euroscarf wurde zunächst auf eine Mutation im kodierenden Bereich von *WHI2* untersucht. Dazu wurde *WHI2* mit PCR amplifiziert und das erhaltene Produkt sequenziert. Tatsächlich zeigte die Sequenz eine Punktmutation nach 206 Basenpaaren von T zu G, was zu einem Stopcodon nach nur 68 Aminosäuren führt (Abbildung 32). Da Whi2 im Wildtyp aus 486 Aminosäuren besteht, ist davon auszugehen, dass kein funktionelles Whi2 in $\Delta fis1^*$ exprimiert wird. Damit könnten reduzierte Mitophagie und Autophagie in einem Mangel an Whi2 begründet sein.

A

N-terminale Sequenz von Whi2

Wildtyp

MDDIITQVSPDNAESAPILQEQQQQNSQYEGNEEDYGDSLIIHLNIQENHYFITRDQL
MSLPESLLLCLFPSGVF... 486

$\Delta fis1^*$

MDDIITQVSPDNAESAPILQEQQQQNSQYEGNEEDYGDSLIIHLNIQENHYFITRDQL
MSLPESLLLC* 68

B

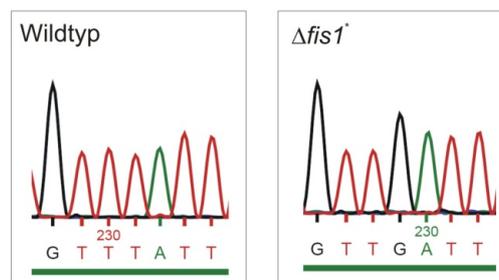


Abbildung 32: Ergebnisse der Sequenzierung von *WHI2* in $\Delta fis1^*$. A Die Proteinsequenz von Whi2 wurde über Sequenzierung der DNA aus dem *WHI2*-Lokus aus Wildtyp oder $\Delta fis1^*$ ermittelt. B Chromatogramm der DNA-Sequenz von Wildtyp und $\Delta fis1^*$ mit Basenaustausch an Position 206 von T zu G.

3.4.2 Mitophagie ist abhängig von *WHISKEY2*

Es wurde daher im nächsten Schritt überprüft, ob Whi2 einen Einfluss auf Mitophagie und Autophagie zeigt. Ein $\Delta whi2$ -Stamm wurde unter Expression von mtPho8 oder cytPho8 in SG-Medium kultiviert und für 24 Stunden mit Rapamycin behandelt. Die korrekte Lokalisation von mtPho8 in $\Delta whi2$ wurde mittels Zellfraktionierung bestätigt (Abbildung 33).

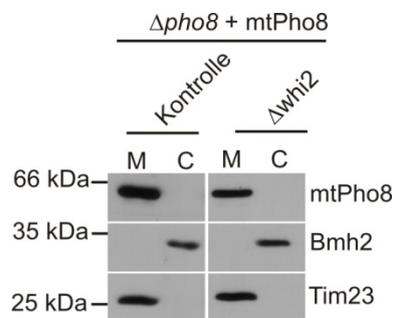


Abbildung 33: In $\Delta whi2$ ist mtPho8 richtig lokalisiert. Mitochondrien (M) und Zytoplasma (C) wurden über Differentialzentrifugation aus Zellextrakten der angegebenen Stämme separiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot auf korrekte mtPho8-Lokalisation analysiert.

Im Vergleich zum Kontrollstamm war die Mitophagie in $\Delta whi2$ um 50% reduziert (Abbildung 34). Hingegen war die Autophagie nur um etwa 10% reduziert, was noch innerhalb der Standardabweichung der Methode liegt. Fluoreszenzmikroskopie zeigte ebenfalls eine Reduktion der Akkumulation von mtDsRed in der Vakuole um 60% (Abbildung 35). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Whi2 notwendig für Mitophagie und möglicherweise zu einem geringeren Teil auch für Autophagie ist.

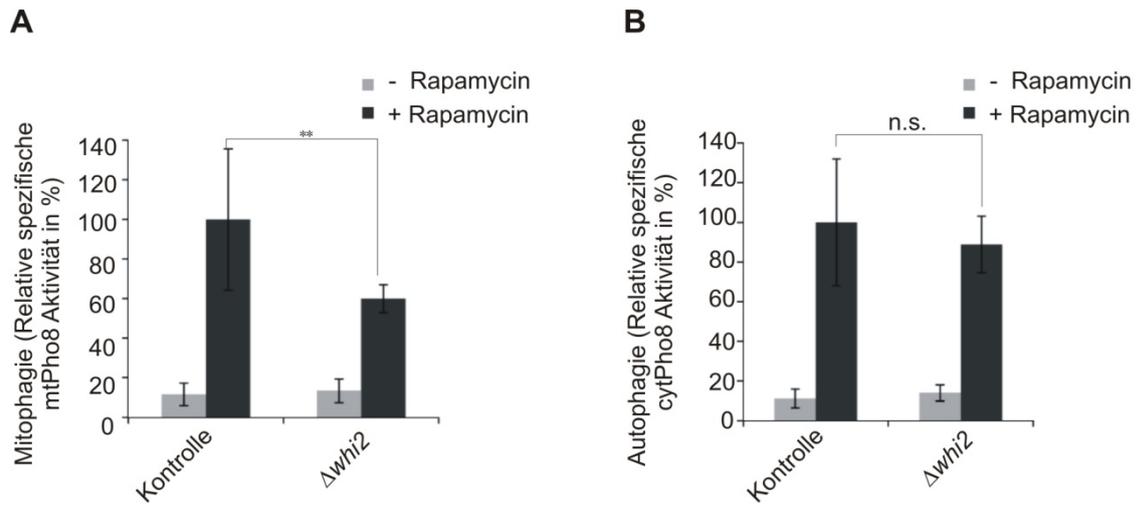


Abbildung 34: Mitophagie ist reduziert in $\Delta whi2$. A-B Der Kontrollstamm oder $\Delta whi2$ wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytoPho8 (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytoPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n \geq 5$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung, signifikant mit ** $p < 0.001$.

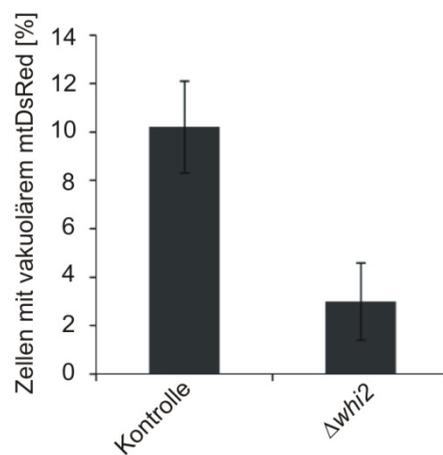
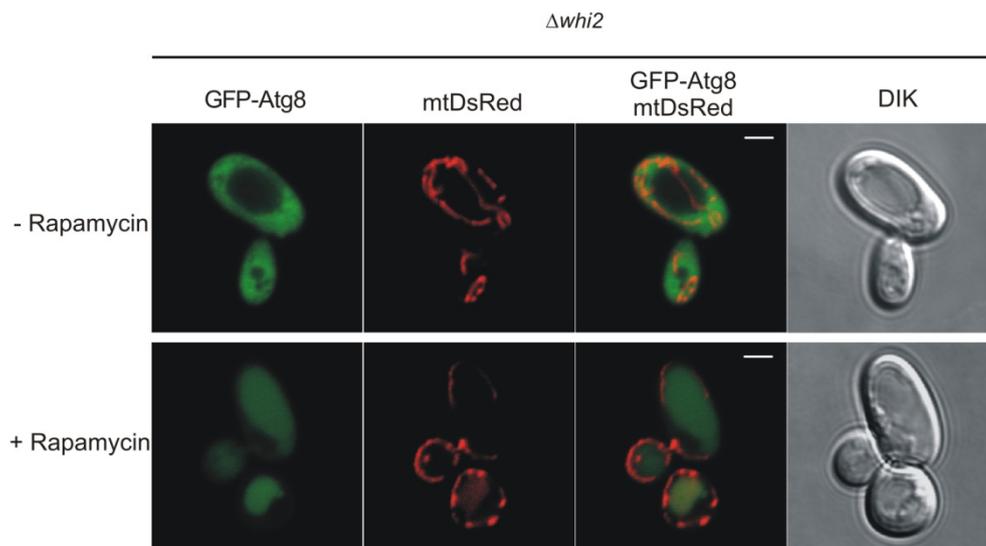


Abbildung 35: Akkumulation des mitochondrialen Fluoreszenzmarkers DsRed in der Vakuole ist in $\Delta whi2$ reduziert. $\Delta whi2$ wurde unter Expression von mtDsRed und GFP-Atg8 in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase mit DMSO (- Rapamycin) oder Rapamycin für 7,5 h behandelt und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert, Skalierung 2 μm , (DIK – Differentialinterferenzkontrast). Zellen mit vakuolär akkumuliertem mtDsRed wurden ausgezählt und der Prozentsatz zur Gesamtzellzahl im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) angegeben. Die Ergebnisse der Auszählung entsprechen Mittelwerten $\pm s$ ($n \geq 3$). Die Durchführung und das Erstellen der Bilder wurden von Angelo Occhipinti ausgeführt.

3.4.3 Der Mitophagiedefekt in $\Delta fis1^*$ wird durch Expression von *WHI2* kompensiert

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob der Mitophagie-Phänotyp der Deletionsstämme $\Delta fis1^*$ und $\Delta whi2$ durch Expression von entweder Fis1 oder Whi2 kompensiert wird. Die zur Expression verwendeten Plasmide enthielten einen Ars/Cen Replikationsursprung für eine geringe Kopiezahl in den Zellen und den endogenen Promotor des jeweiligen Proteins. Damit war die Kopiezahl von Fis1 und Whi2 in etwa vergleichbar mit dem Wildtyp. Die Stämme wurden in SG-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für 24 Stunden mit Rapamycin behandelt. Der Anstieg der mtPho8-Aktivität nach Rapamycin-Behandlung war in $\Delta fis1^*$ auch unter zusätzlicher Expression von Fis1 gegenüber dem Kontrollstamm reduziert (Abbildung 36A-B). Die Expression von Whi2 führte jedoch zu einem Anstieg der mtPho8-Aktivität ähnlich dem im Kontrollstamm. Demnach wurde der Mitophagie-Defekt durch die Expression von Whi2 sowohl in $\Delta fis1^*$ als auch in $\Delta whi2$ kompensiert. In diesem Experiment zeigte Whi2 auch einen Effekt auf die Autophagie, der jedoch geringer war als der Effekt auf die Mitophagie. Die cytPho8-Aktivitäten waren nach Rapamycin-Behandlung in den Vektorkontrollen von sowohl $\Delta fis1^*$ als auch $\Delta whi2$ um 30% reduziert. Expression von Whi2, jedoch nicht von Fis1, komplementierte diesen Effekt vollständig. Die Analyse der Lysate auf den Abbau mitochondrialer Proteine mittels SDS-PAGE und Westernblot bestätigten die Ergebnisse des ALP-Assays (Abbildung 36C-D). Fluoreszenzmikroskopie zeigte ebenfalls eine vollständige Kompensation der vakuolären mtDsRed-Akkumulation in $\Delta fis1^*$ und $\Delta whi2$ durch Expression von Whi2 (Abbildung 37). Interessanterweise zeigte auch die Expression von Fis1 in $\Delta fis1^*$ verglichen mit $\Delta fis1^+$ +Vektor eine leichte Erhöhung des vakuolär akkumulierten mtDsRed. Dieser Effekt ist jedoch auf die Schwankungen der Messwerte in diesem Stamm zurückzuführen und weist daher vermutlich nicht auf einen spezifischen Einfluss von Fis1 auf die Mitophagie hin. Auch die mtPho8-Aktivität in $\Delta whi2$ +Vektor spricht für diese Interpretation. Insgesamt

lässt sich schlussfolgern, dass Whi2, jedoch nicht Fis1, ein notwendiger Faktor für die effiziente Induktion von Mitophagie ist.

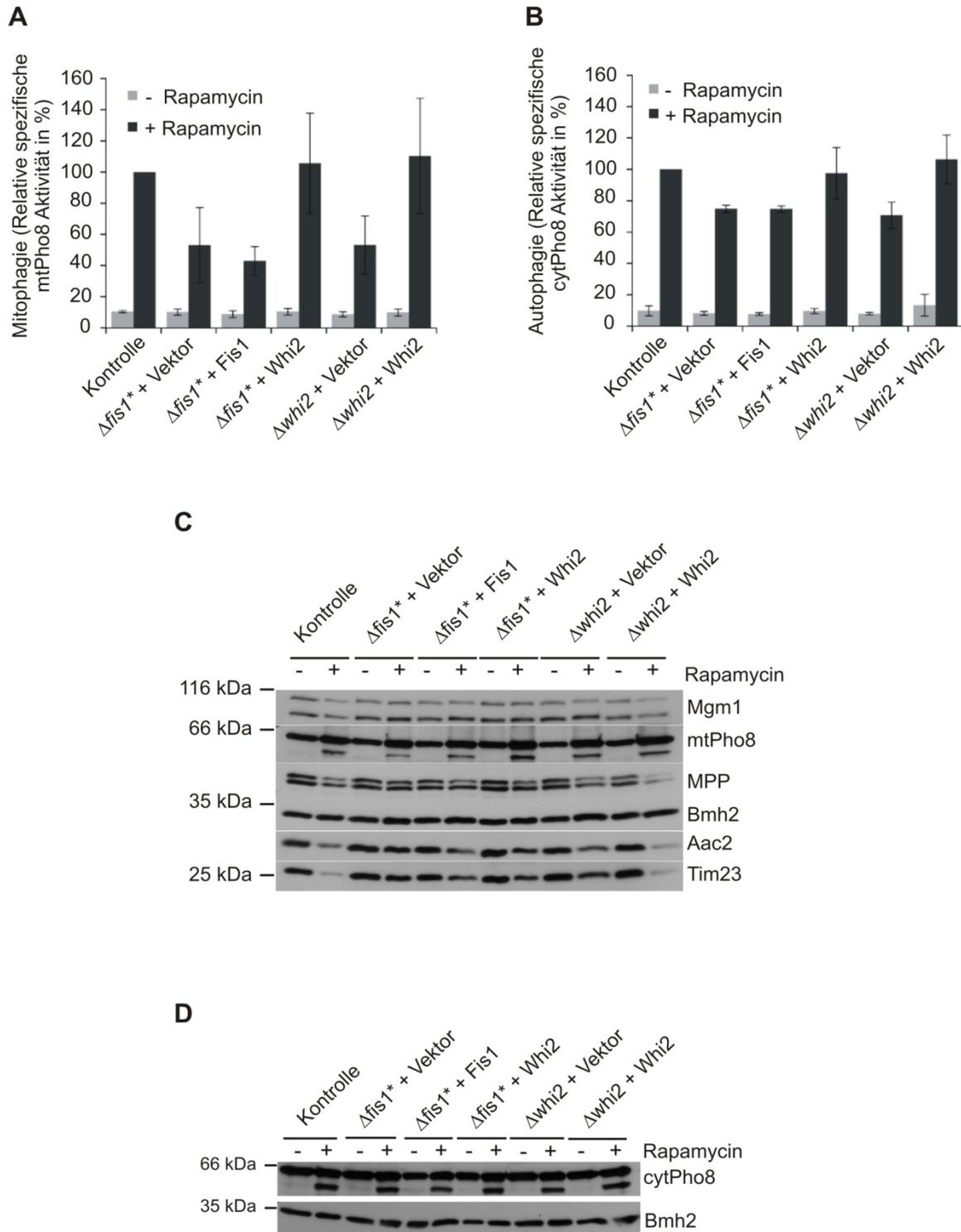


Abbildung 36: Expression von Whi2 kompensiert den Defekt der Mitophagie in $\Delta fis1^*$ und $\Delta whi2$. A-D Angegebene Stämme wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytPho8 (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. A-B Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n = 3$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung. C-D Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den Gehalt mitochondrialer Proteine sowie mtPho8-Prozessierung (C) oder cytPho8-Prozessierung (D) analysiert.

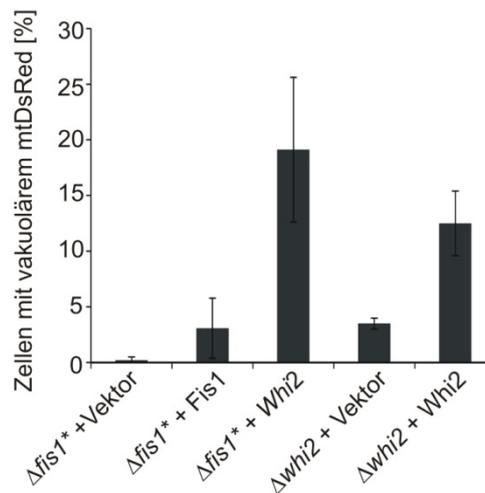


Abbildung 37: Whi2-Expression erhöht die Zahl an Zellen mit vakuolär akkumuliertem mtDsRed in $\Delta fis1^*$ und $\Delta whi2$ vergleichbar mit Wildtyp. Angegebene Stämme wurden unter Expression von mtDsRed in SG-Medium kultiviert, in exponentieller Wachstumsphase mit DMSO (- Rapamycin) oder Rapamycin für 7,5 h behandelt und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zellen mit vakuolär akkumuliertem mtDsRed wurden ausgezählt und der Prozentsatz zur Gesamtzellzahl im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) angegeben. Die Ergebnisse der Auszählung entsprechen Mittelwerten $\pm s$ ($n \geq 3$). Die Durchführung wurde von Angelo Occhipinti ausgeführt.

3.4.4 In einem $\Delta fis1$ -Stamm ohne *WHI2*-Mutation sind Mitophagie und Autophagie nicht beeinträchtigt

Basierend auf den Komplementationsstudien sollten Mitophagie und Autophagie in einem *fis1*-Deletionsstamm ohne *WHI2*-Mutation nicht beeinträchtigt sein. Dazu wurden neue *Fis1*-Stämme durch Austausch von *FISI* gegen ein Kanamycin-Resistenzgen generiert. In den Stammhintergründen BY4741 bzw. BY4742 kam es nach der Deletion von *FISI* unmittelbar zur Anhäufung einer Punktmutation in *WHI2*. Diese Mutation unterschied sich in der Position des Codons, führte jedoch auch zu einem verfrühten Stopcodon (nicht gezeigt). Im Stammhintergrund W303 konnte die *FISI*-Deletion jedoch erfolgreich eingeführt werden, ohne dass sich eine weitere Mutation in *WHI2* bildete. In diesem Stamm

wurden Mitophagie und Autophagie mittels ALP-Assay in SG-Medium nach 24 Stunden Behandlung mit Rapamycin analysiert. In Einklang mit den vorherigen Ergebnissen war der Anstieg der mtPho8- und cytPho8-Aktivität nach Rapamycin-Behandlung in $\Delta fis1$ nicht verschieden vom korrespondierenden Kontrollstamm (Abbildung 38).

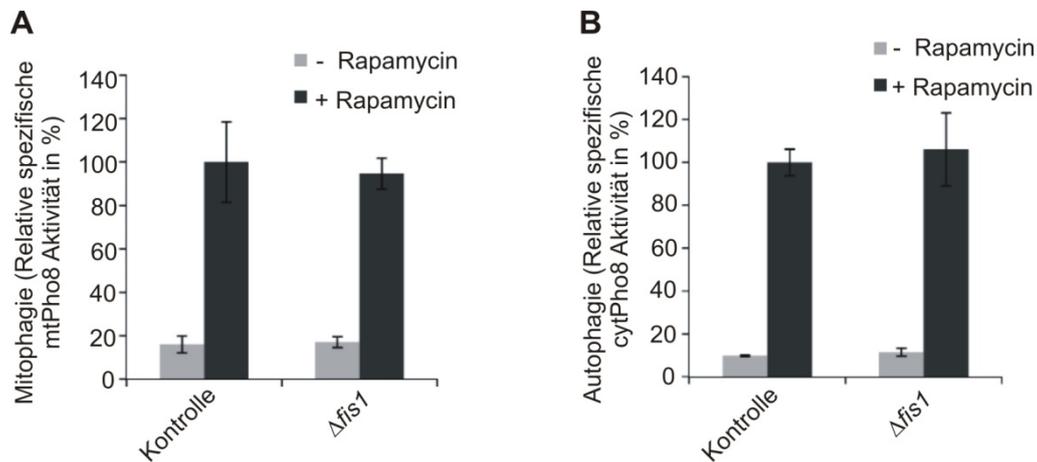


Abbildung 38: Mitophagie in einem $\Delta fis1$ -Stamm ohne Mutation in WHI2 ist vergleichbar mit Wildtyp. A-B Der Kontrollstamm und $\Delta fis1$ wurden unter Expression von mtPho8 (A) oder cytPho8 (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24 h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ (n = 3), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass kein Faktor der mitochondrialen Teilung notwendig für Mitophagie ist. Es muss daher andere Faktoren geben, die bei der Sequestration die Abtrennung der Mitochondrien vom tubulären Netzwerk übernehmen. Es wurde jedoch ein Protein identifiziert, Whi2, welches die Induktion der Mitophagie und zu einem geringeren Teil auch der Autophagie beeinflusst. Im Folgenden wurde die Rolle von Whi2 in der Mitophagie weiter untersucht.

3.5 Der Einfluss von *Whiskey2* auf die Mitophagie

3.5.1 Der Cvt-Weg ist nicht abhängig von *Whi2*

Bisher ist über die Funktion von *Whi2* wenig bekannt. Jedoch wurden aus Beobachtungen von *WHI2*-Deletionsstämmen einige mögliche Funktionen abgeleitet. Demnach wurde *Whi2* hauptsächlich in Verbindung mit der Kontrolle des Zellzyklus gebracht (Saul und Sudbery, 1985; Mountain und Sudbery, 1990b; Mountain und Sudbery, 1990a; Radcliffe *et al.*, 1997). Desweiteren sind Veränderungen des Zytoskeletts und eine verminderte Stressantwort beobachtet worden (Kaida *et al.*, 2002; Leadsham *et al.*, 2009). Es gibt derzeit keine Hinweise, dass *Whi2* ähnlich den Atg-Proteinen eine mechanistische Funktion in der Autophagie erfüllt. Da jedoch der Effekt von *Whi2* auf selektive Mitophagie größer ist als auf nicht-selektive Autophagie, ist unklar, ob *Whi2* wichtig für andere Formen selektiver Mitophagie ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Prozessierung von *Ape1*, einem Substrat des Cvt-Wegs, in $\Delta whi2$ analysiert. In exponentiell wachsenden Kulturen waren sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta whi2$ die *Ape1*-Vorstufe (p-*Ape1*) und prozessiertes *Ape1* (m-*Ape1*) vorhanden, während in $\Delta atg1$ nur die nicht prozessierte Vorstufe vorhanden war (Abbildung 39). Nach Induktion von Autophagie durch Behandlung mit Rapamycin für fünf Stunden lag *Ape1* im Wildtyp und in $\Delta whi2$ vollständig prozessiert vor. In $\Delta atg1$ erfolgte auch unter diesen Bedingungen keine Prozessierung von *Ape1*, was bestätigt, dass in diesem Stamm alle Formen von Autophagie gestört sind. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass der Cvt-Weg in $\Delta whi2$ nicht beeinträchtigt ist und dass *Whi2* damit über keine allgemeine Funktion in der selektiven Autophagie verfügt.

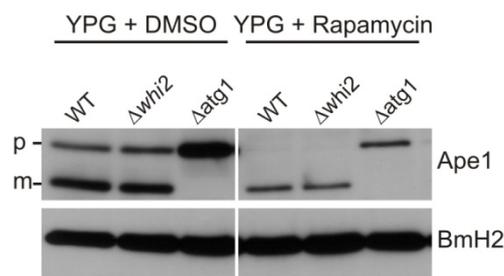


Abbildung 39: Der Cvt-Weg ist in $\Delta whi2$ nicht beeinträchtigt. Angegebene Stämme wurden in YPG-Medium kultiviert und für 5h mit DMSO oder Rapamycin inkubiert. Die Prozessierung von *Ape1* wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

3.5.2 Das Zytoskelett ist in $\Delta whi2$ durch Rapamycin-Behandlung nicht beeinträchtigt

Unter anderem wurde in $\Delta whi2$ -Stämmen eine Depolarisierung und Aggregation des Aktins während der Umstellung des Hefestoffwechsels von Fermentation zu Atmung (*diauxic shift*) festgestellt (Leadsham et al., 2009). Es ist außerdem bekannt, dass ein funktionelles Zytoskelett für selektive Formen von Autophagie notwendig ist (Reggiori et al., 2005). Damit könnte der Mitophagiedefekt in $\Delta whi2$ durch die Aggregation von Aktin und die damit verbundene Störung des Zytoskeletts verursacht werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Kulturen des Kontrollstamms und $\Delta whi2$ unter den üblichen Bedingungen angezogen, vor oder nach Zugabe von Rapamycin fixiert und das Aktin-Zytoskelett angefärbt. Anschließend wurden die Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop auf die Struktur des Aktins untersucht. Sowohl vor als auch nach der Behandlung mit Rapamycin konnten keine Unterschiede zwischen $\Delta whi2$ und dem Kontrollstamm festgestellt werden (Abbildung 40). In exponentiell wachsenden Kulturen zeigten alle Zellen ein sehr gut ausgeprägtes Zytoskelett mit polarisierten Aktin-Kabeln. Rapamycin verursacht normalerweise eine Depolarisierung des Aktins. Danach kommt es unmittelbar zu einer erneuten Ausbildung des Zytoskeletts über Formine, jedoch in einem unpolarisierten Zustand (Torres et al., 2002). In Einklang damit war nach Rapamycin-Behandlung keine Änderung der Struktur des Zytoskeletts im Wildtyp erkennbar. Jedoch auch in $\Delta whi2$ konnten nach Zugabe von Rapamycin keine Aktin-Aggregate beobachtet werden. Damit lässt sich nicht bestätigen, dass der Mitophagie-Phänotyp in $\Delta whi2$ durch ein gestörtes Aktin-Zytoskelett verursacht wird.

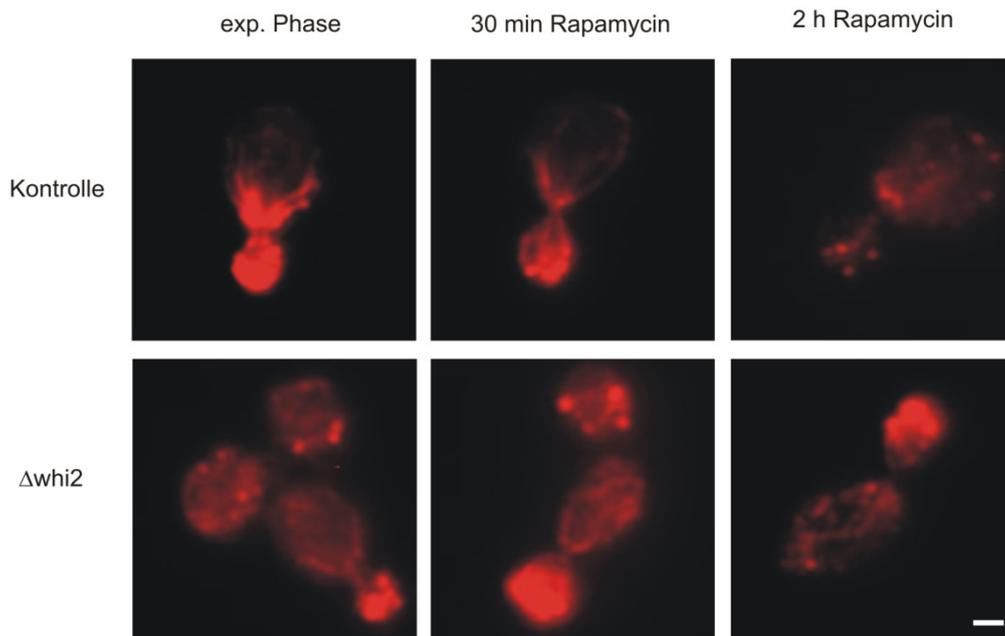


Abbildung 40: Das Zytoskelett in $\Delta whi2$ weist nach Behandlung mit Rapamycin keine Auffälligkeiten auf. Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) und $\Delta whi2$ wurden unter Expression von mtDsRed in SG-Medium kultiviert und für 30 min oder 2 h mit Rapamycin behandelt. Zellen wurden vor (exp. Phase) oder nach Rapamycin-Behandlung mit Formaldehyd fixiert, das Aktin mit Alexa-Fluor-Phalloidin angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Morphologie des Zytoskeletts analysiert. Skalierung 1 μm .

3.5.3 Die generelle Stressantwort hat einen Einfluss auf Mitophagie und Autophagie

Eine weitere Studie zur Funktion von Whi2 beschreibt einen Zusammenhang mit der generellen Stressantwort (Kaida et al., 2002). Die Autoren zeigen eine physische Interaktion von Whi2 mit der Phosphatase Psr1 und dem Transkriptionsfaktor Msn2. Diese Interaktion deutet darauf hin, dass Whi2 die Dephosphorylierung von Msn2 durch Psr1 reguliert. Der Phosphorylierungsgrad von Msn2 beeinflusst dessen Aktivierung und somit die Expression von Genen der generellen Stressantwort unter dem Einfluss von Stressfaktoren, wie zum Beispiel Hitzeschock oder auch Nährstoffentzug. Zusätzlich ist bekannt, dass die Inhibierung der TOR1-Kinase die Bindung von Msn2 und dem Paralog Msn4 an Bmh2 im Zytoplasma auflöst, was die Relokalisation der Transkriptionsfaktoren an ihren Funktionsort, den Zellkern, und damit ihre Aktivierung verursacht. Es ist daher möglich, dass in $\Delta whi2$ eine verminderte generelle Stressantwort die Rapamycin-induzierte Mitophagie und Autophagie reduziert. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurden Deletionsmutanten für Psr1, Msn2 und Msn4 untersucht. Der $\Delta psr1$ -Stamm zeigte nach

24-stündiger Rapamycin-Behandlung in SG-Medium ebenfalls eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der Mitophagie um 20%, jedoch keinen Einfluss auf die Autophagie (Abbildung 41). Der Mitophagie-Phänotyp ist im Vergleich mit $\Delta whi2$ etwas abgeschwächt, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die teilweise komplementäre Funktion von *Psr2* zurückzuführen ist. Das Ergebnis deutet jedoch darauf hin, dass *Whi2* die Mitophagie über die Aktivität von *Psr1* beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten die Deletionsmutanten $\Delta msn2$ und $\Delta msn4$ eine Erhöhung der Mitophagie und Autophagie um bis zu 50%. Demnach ist die generelle Stressantwort nicht direkt für die Induktion von Mitophagie oder Autophagie notwendig. Es scheint jedoch, dass die generelle Stressantwort das Maß an Mitophagie und Autophagie direkt oder indirekt beeinflusst. Diese Beeinflussung ist jedoch gegenläufig zum Effekt von *Whi2* und *Psr1* auf Mito- und Autophagie und liefert damit noch keine klare Zuordnung der Funktion von *Whi2*.

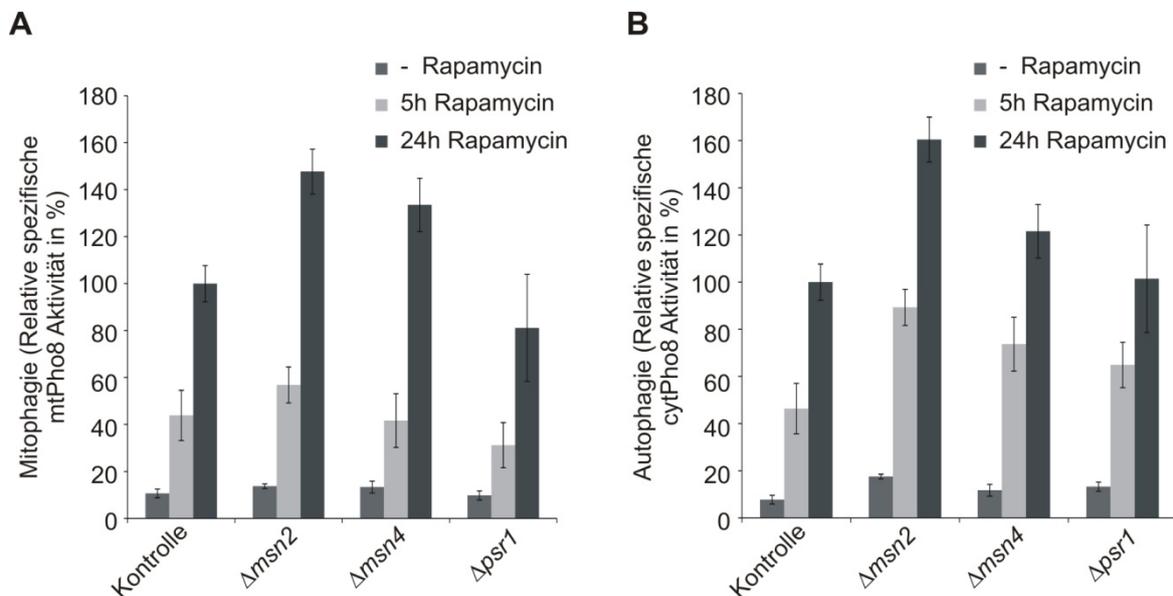


Abbildung 41: Mitophagie und Autophagie sind in Deletionsmutanten der generellen Stressantwort erhöht. A-B Angegebene Stämme wurden unter Expression von *mtPho8* (A) oder *cytoPho8* (B) in SG-Medium kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach Rapamycin-Behandlung für angegebene Zeitpunkte mittels ALP-Assay analysiert. Der Kontrollstamm entspricht $\Delta pho8$. Mitophagie (A) wurde über die *mtPho8*-Aktivität, Autophagie (B) über die *cytoPho8*-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n = 3$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung.

3.5.4 Mitophagie könnte wie Autophagie über den PKA-Signaltransduktionsweg reguliert werden

Die Deletion von *WHI2* wurde desweiteren mit der Überaktivierung des Ras-cAMP-PKA (Proteinkinase A) -Signaltransduktionswegs in Zusammenhang gebracht (Leadsham et al., 2009). PKA besteht aus drei funktionellen Proteinuntereinheiten, Tpk1, Tpk2, Tpk3, und einer regulatorischen Untereinheit, Bcy1. Die Aktivierung von PKA erfolgt über cAMP, in dem es an Bcy1 bindet und die funktionellen Untereinheiten in aktiver Form freisetzt. Der Botenstoff cAMP wird in Bäckerhefe über die Adenylatzyklase Cyr1 an der Plasmamembran gebildet, was durch die GTPasen Ras1, Ras2 und Gpa2 stimuliert wird. Der Ras-cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg reguliert den Energiestoffwechsel in Abhängigkeit der verfügbaren Kohlenhydrate und ist neben TORC1 und TORC2 der zweite Mechanismus, den Zellzyklus an die Nährstoffbedingungen anzupassen. Es ist bekannt, dass sich ein erhöhter cAMP-Gehalt durch konstitutive Aktivierung der PKA inhibierend auf die Autophagie auswirkt (Noda und Ohsumi, 1998; Budovskaya et al., 2004; Stephan et al., 2010). Die Inhibierung erfolgt über die direkte Hyperphosphorylierung von Atg13, welches in dieser Form nicht an Atg17 und Atg1 binden kann, um die Autophagie auszulösen. Es wurde folglich untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Mitophagie und der PKA-Aktivität vorliegen könnte. Während des Wachstums auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen sowie in der stationären Phase ist die PKA-Aktivität gering. Der Zusatz von Glukose resultiert in einem kurzzeitigen Peak der cAMP-Konzentration, was zur Aktivierung der PKA und folglich der Phosphorylierung ihrer Substrate führt. Die Aktivität der PKA ist während des Wachstums in Glukose-haltigem Medium daher höher. Die PKA-Aktivität wird vermutlich auch über andere Signale reguliert, da der cAMP-Gehalt die erhöhte PKA-Aktivität während des Wachstums auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen nur unvollständig erklärt (Thevelein und de Winde, 1999). Daher wurde Mitophagie zunächst in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle untersucht. Dazu wurden die Hefekulturen in Medien mit Glukose, Galaktose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle angezogen und mit Rapamycin für fünf oder 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden Mitophagie und Autophagie mittels ALP-Assay bestimmt (Abbildung 42). Während Autophagie unter allen Bedingungen gleich stark induziert wurde, konnte man für Mitophagie deutliche Unterschiede feststellen. In respiratorischem Medium, mit Glycerin als nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle, war die Aktivierung von Mitophagie am stärksten. Enthielt das Medium Glukose, welche von Hefen ausschließlich fermentiert wird, konnte

kein signifikanter Anstieg der mtPho8-Aktivität und damit keine Mitophagie beobachtet werden. Enthielt das Medium Galaktose, ein Zucker, der nach der Glykolyse vollständig zu H_2O und CO_2 verstoffwechselt wird, konnte eine Induktion der Mitophagie nach 24 Stunden beobachtet werden. Jedoch war die Mitophagie in Galaktose-haltigem Medium gegenüber respiratorischem Medium deutlich reduziert. Die Abhängigkeit der Mitophagie-Intensität von der Kohlenstoffquelle könnte auf einen verstärkten Einfluss der PKA-Aktivität auf die Mitophagie im Vergleich zur Autophagie hinweisen. Die Unterschiede könnten jedoch auch durch die respiratorische Aktivität bedingt sein.

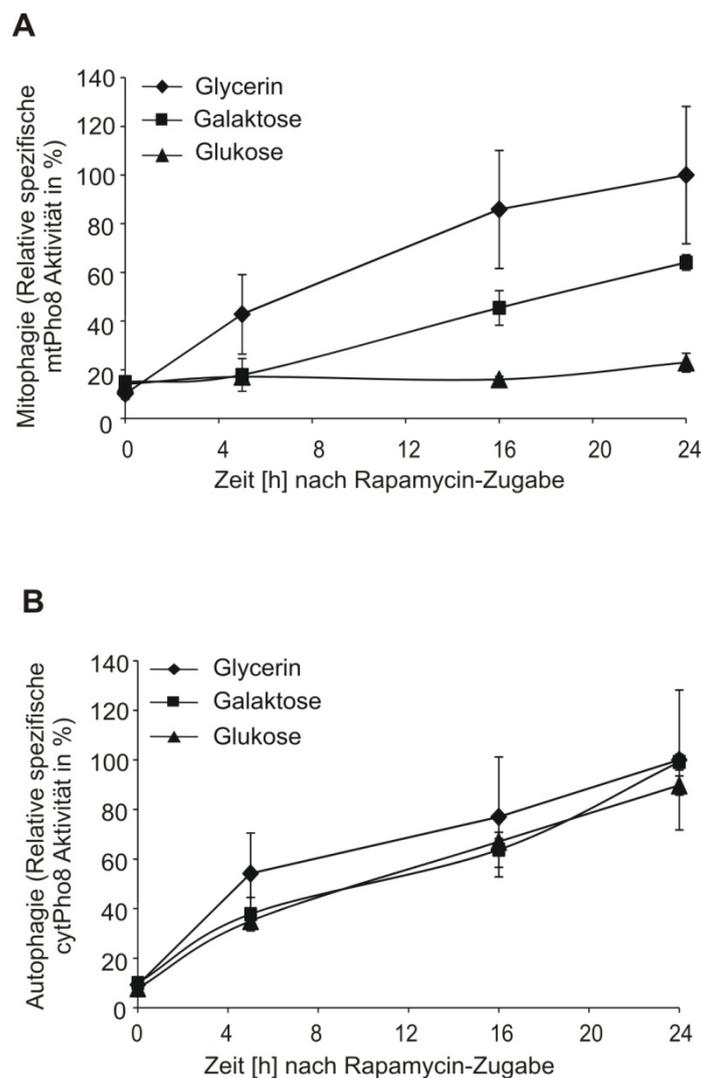


Abbildung 42: Mitophagie wird durch fermentierbare Kohlenstoffquellen reprimiert. A-B Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) wurde unter Expression von mtPho8 (A) oder cytPho8 (B) in den angegebenen Medien kultiviert und in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach Rapamycin-Behandlung für angegebene Zeiträume mittels ALP-Assay analysiert. Mitophagie (A) wurde über die mtPho8-Aktivität, Autophagie (B) über die cytPho8-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ ($n = 3$), relativ zur Kontrolle nach 24 h Rapamycin-Behandlung.

In Glukose-haltigem Medium ist die Expression von Genen reprimiert, die Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren. Damit wird die Respiration unterbunden, was die Inhibierung der Mitophagie verursachen könnte. In diesem Fall müsste die Induktion von Mitophagie in Glukose wieder möglich sein, wenn die Reprimierung der Genexpression verhindert wird. Dazu wurde Mitophagie im Stamm $\Delta reg1$ analysiert, in welchem die Genexpression nicht reprimiert ist und Respiration auch in Glukose-haltigem Medium abläuft (Tu und Carlson, 1995). Jedoch war auch in diesem Stamm die Mitophagie in Glukose-haltigem Medium inhibiert (Abbildung 43). Damit ist nicht die respiratorische Aktivität allein der entscheidende Faktor für die Induktion der Mitophagie.

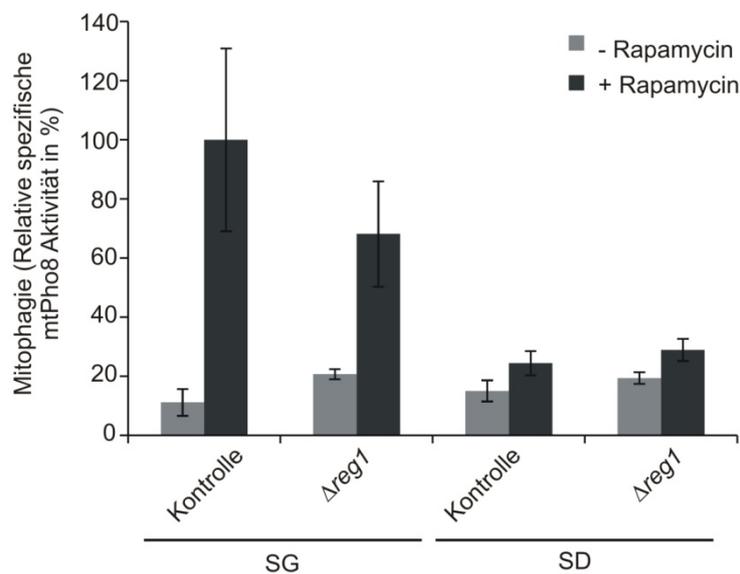


Abbildung 43: Mitophagie wird in $\Delta reg1$ durch Glukose reprimiert. Der Kontrollstamm ($\Delta pho8$) und $\Delta reg1$ wurden unter Expression von mtPho8 in SG- oder SD-Medium kultiviert und Mitophagie in exponentieller Wachstumsphase (- Rapamycin) oder nach 24h Rapamycin-Behandlung mittels ALP-Assay analysiert. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm s$ (n = 3), relativ zur Kontrolle nach 24h Rapamycin-Behandlung.

4 Diskussion

4.1 Rapamycin induziert selektive Mitophagie

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Mitophagie in Folge der Inhibierung von TORC1 durch Rapamycin und Stickstoffentzug induziert wird. Dies ist im Einklang mit vorherigen Studien (Camougrand et al., 2004; Kanki und Klionsky, 2008). TORC1 reguliert bei genügender Nährstoffzufuhr über Phosphorylierung seiner Substrate die Zellproliferation. Nährstoffentzug und andere Stressfaktoren führen zur Inhibierung von TORC1 und damit zum Proliferationsstopp, zur Aktivierung der generellen Stressantwort und der nicht-selektiven Autophagie. Wie die extrazellulären Signale zur Inhibierung von TORC1 führen, ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Rapamycin ist eine chemische Substanz, welche TORC1 direkt inhibiert und ebenfalls nicht-selektive Autophagie induziert (Noda und Ohsumi, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die Mitophagie im Gegensatz zur Autophagie durch Rapamycin stärker induziert wird als durch Stickstoffentzug. Ergebnisse einer anderen Studie weisen darauf hin, dass Stickstoffentzug TORC1 über einen anderen Mechanismus inhibiert als Rapamycin (Tate et al., 2009). Das könnte dafür sprechen, dass verschiedene Mechanismen der TORC1-Inhibierung existieren, die sich unterschiedlich auf die Signaltransduktion und damit auf die Mitophagie auswirken. Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass durch den Wechsel von respiratorischem Selektivmedium zum entsprechenden stickstofffreiem respiratorischen Selektivmedium die Mitophagie ähnlich stark induziert wird wie beim Wechsel zu einem stickstofffreien Medium mit Glukose als fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Jedoch zeigte eine andere Studie, dass der Wechsel von respiratorischem Vollmedium zu stickstofffreiem Selektivmedium mit Glukose die Mitophagie stärker induziert als der Wechsel zu stickstofffreiem, respiratorischem Selektivmedium (Kanki et al., 2009b). Daher könnten sich sonstige Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel der Ras-cAmp-PKA-Signaltransduktionsweg, ebenfalls unterschiedlich auf Autophagie und Mitophagie auswirken. Die Bedingungen zur Induktion der Mitophagie sollten daher im Vergleich zur Autophagie in weiteren Studien adressiert werden.

Bisher wurde in der Literatur zwischen selektiver und nicht-selektiver Mitophagie unterschieden. Dabei handelt es sich bei der nicht-selektiven Mitophagie um den zufälligen Einschluss von Mitochondrien durch Autophagosomen, wobei keine spezifische Rekrutierung an die PAS über Atg11 notwendig ist. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass Mitophagie, welche durch Stickstoffentzug induziert wurde, von den Faktoren für selektive Mitophagie, Atg11, Atg20 und Atg24, abhängt. In der vorliegenden Arbeit war die Rapamycin-induzierte Mitophagie ebenfalls abhängig von diesen Faktoren und kann daher als selektive Form der Autophagie betrachtet werden. In $\Delta atg11$ wurde keine Induktion von Mitophagie detektiert, obwohl nicht-selektive Autophagie gleichzeitig ablief. Das deutet darauf hin, dass der zufällige Einschluss von Mitochondrien durch die nicht-selektive Autophagie minimal ist. Desweiteren war Mitophagie in Glukose-haltigem Medium vollkommen abwesend. In einer anderen Studie wurde ebenfalls beobachtet, dass die Mitophagie in Glukose-haltigem Medium gegenüber respiratorischem Medium nach Stickstoffentzug deutlich reduziert war (Camougrand et al., 2004). Es ist daher davon auszugehen, dass die Zelle über Mechanismen verfügt, die sehr genau regulieren, welche Zellbestandteile über Autophagie abgebaut werden.

Eine weitere Frage ist, inwiefern die TORC1-Inhibierung durch Rapamycin oder Stickstoffentzug zum Abbau von dysfunktionellen Mitochondrien führt. In der vorliegenden Arbeit konnte nicht differenziert werden, ob die abgebauten Mitochondrien funktionell waren oder nicht. Desweiteren war die Induktion der Mitophagie abhängig von der Kohlenstoffquelle. Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass Mitophagie ähnlich der Pexophagie unter diesen Bedingungen ausschließlich der Anpassung des Metabolismus an die limitierte Nährstoffzufuhr dient. Andererseits wurde in einer Studie, in der Mitophagie durch mitochondriale Dysfunktion ausgelöst wurde, auch eine Induktion der Autophagie beobachtet (Priault et al., 2005). Dementsprechend könnte TORC1 auch die durch mitochondriale Dysfunktion induzierte Mitophagie regulieren. Erkenntnisse, die durch TORC1-Inhibierung über Mitophagie gewonnen werden, könnten damit auch auf andere Bedingungen übertragbar sein.

4.2 Induktion der Mitophagie resultiert nicht in Fragmentierung der Mitochondrien

Die Induktion der Mitophagie führte in dieser Studie nicht zur Fragmentierung von Mitochondrien. Desweiteren konnten nach Rapamycin-Behandlung seltener isolierte mitochondriale Fragmente beobachtet werden als während der exponentiellen Wachstumsphase (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde in Säugerzellen unter Nährstoffmangel und anderen Stressbedingungen sogar eine stärkere Netzwerkbildung mit verlängerten Tubuli beobachtet (Tondera et al., 2009). Diese Morphologie wurde durch verstärkte Fusion erzeugt, welche als Hyperfusion bezeichnet wird. Das könnte darauf hindeuten, dass Mitophagie auch unter unspezifischen Stressbedingungen, wie zum Beispiel Nährstoffentzug, bevorzugt mitochondriale Fragmente abbaut. Die Hyperfusion könnte demnach dem Schutz vor einem unspezifischen Einschluss der funktionellen Mitochondrien in Autophagosomen dienen.

4.3 Mitophagie wird nicht durch Fragmentierung der Mitochondrien induziert

Studien in Säugerzellmodellen deuteten darauf hin, dass Mitophagie durch die Reduktion des Membranpotenzials induziert wird. Desweiteren konnte Mitophagie in Bäckerhefe durch mitochondriale Dysfunktionen induziert werden, die ebenfalls zu einer Reduktion des Membranpotenzials führten (Priault et al., 2005; Nowikovsky et al., 2007). Da Mitochondrien bei Verlust des Membranpotenzials auch fragmentieren, stellte sich die Frage, ob die Fragmentierung ausreicht, um Mitophagie zu induzieren. In dieser Studie wurde die Fragmentierung durch einen Block der GTPase-Aktivität von Mgm1 bei 37°C in einer Temperatur-sensitiven Mutante induziert. Jedoch führte die Fragmentierung allein nicht zur Induktion von Mitophagie. Auch eine längere Inhibierung der Mgm1-abhängigen Fusion, welche zu Verlust von mtDNA in Tochterzellen führt und somit dysfunktionelle Mitochondrien erzeugen sollte, führte nach einer Erholungsphase trotz Wiederherstellung der normalen tubulären Morphologie nicht zu einem messbaren Anstieg der Mitophagie. Sehr wahrscheinlich ist für die Induktion von Mitophagie ein zusätzliches Signal notwendig. Bemerkenswerterweise führten jedoch auch die Inhibierung der Atmungskette

durch Antimycin, die Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung durch Oligomycin und die Depletion des Membranpotenzials durch CCCP oder Valinomycin nicht zur Induktion von Mitophagie (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird der zelluläre Metabolismus der Zelle durch diese Chemikalien so stark beeinträchtigt, dass die Induktion von Autophagie bzw. Mitophagie und andere Mechanismen der Stressantwort nicht mehr möglich sind. Ein Absterben der Zellen wurde jedoch nicht beobachtet. Alternativ könnte eine unvollständige Dissipation des Membranpotenzials die Ursache sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Mitophagie, welche durch Fragmentierung oder Behandlung mit Inhibitoren des mitochondrialen Metabolismus induziert wird, so gering ist, dass sie mit dem ALP-Assay nicht detektiert werden kann. Im Fall von CCCP muss ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass der pH-Gradient über die Vakuolenmembran zerstört und damit der pH-Wert im vakuolären Lumen erhöht wird, was zur Inaktivierung der Proteinase A und damit zu einem verminderten hydrolytischen Abbau führt. Dadurch könnte ebenfalls die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole verhindert werden. Die Prozessierung der mitochondrialen Protease ist somit gestört und Mitophagie kann nicht detektiert werden. Um den Abbau dysfunktioneller Mitochondrien über Mitophagie detaillierter zu untersuchen, müssen weitere Modelle der mitochondrialen Dysfunktion in *Saccharomyces cerevisiae* und entsprechend sensitive Methoden etabliert werden.

4.4 Die mitochondriale Teilung ist keine Grundvoraussetzung für Rapamycin-induzierte Mitophagie

Die Hypothese, dass mitochondriale Dynamik und Mitophagie als eine Art Qualitätskontrolle für Mitochondrien dient, legt nahe, dass mitochondriale Teilung für den Abbau mitochondrialer Fragmente über Mitophagie notwendig ist. In dieser Studie wurde jedoch gezeigt, dass Rapamycin-induzierte Mitophagie in Bäckerhefe unabhängig von der mitochondrialen Teilungsmaschinerie abläuft. Weder die Expression von dominant-negativem Dnm1 noch die Deletion der Gene, welche die Faktoren der mitochondrialen Teilungsmaschinerie kodieren, führte zu Inhibierung der Mitophagie. Das steht teilweise in Kontrast zu bereits veröffentlichten Ergebnissen. In einer Studie wurde die Expression von Mdm38 inhibiert, woraufhin die Mitochondrien zunächst einen fragmentierten und geschwollenen Zustand aufwiesen und anschließend der ausgeprägte Abbau von

Mitochondrien in der Vakuole beobachtet wurde (Nowikovsky et al., 2007). In einem Stamm, in dem sowohl *DNMI* als auch *MDM38* deletiert waren, konnte keine Änderung der Morphologie und auch keine Mitophagie beobachtet werden. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Inhibierung der Teilung durch Deletion von *DNMI* die Mitophagie blockiert. Es fehlte jedoch der direkte Vergleich zu dem Stamm, in dem nur *MDM38* deletiert war. Für diesen Stamm wurde zwar die anormale mitochondriale Struktur gezeigt; Daten, die auf Mitophagie in diesem Stamm hinweisen, fehlten jedoch. Um den Zusammenhang zwischen Mitophagie und *Dnm1* unter diesen Bedingungen zu zeigen, müsste man in $\Delta dnm1$ die Expression von *MDM38* inhibieren und die Änderung der Morphologie sowie die Induktion der Mitophagie zeitlich verfolgen. In einer anderen Studie wurde *Dnm1* über ein Screening in stationärer Phase als potentieller Faktor für Mitophagie identifiziert. Zusätzlich war die durch Stickstoffentzug induzierte Mitophagie in $\Delta dnm1$ gegenüber dem Kontrollstamm reduziert (Kanki et al., 2009b). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis unter Bedingungen des Stickstoffentzugs bestätigt werden. Hier war zusätzlich eine Reduktion der Mitophagie in $\Delta caf4$ zu beobachten. Jedoch waren die Effekte in $\Delta dnm1$ und $\Delta caf4$ im Gegensatz zu $\Delta fis1^*$, welcher die *WHI2*-Mutation aufwies, nicht signifikant. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass Mitophagie in $\Delta dnm1$ prinzipiell möglich ist. Die Rapamycin-induzierte Mitophagie war in $\Delta dnm1$ in der vorliegenden Arbeit nicht reduziert. Ein möglicher Effekt auf Mitophagie induziert durch Stickstoffentzug in $\Delta dnm1$ wäre daher wahrscheinlich eher auf sekundäre Effekte während der Induktion zurückzuführen. Die anderen Faktoren der mitochondrialen Teilungsmaschinerie wurden in der Studie von Kanki et al. (2009) nicht als Faktoren für Mitophagie identifiziert. In Übereinstimmung damit wurden auch in einer unabhängig durchgeführten zweiten Untersuchung keine Faktoren der mitochondrialen Teilung als notwendig für Mitophagie identifiziert (Okamoto et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Effekt auf Mitophagie und Autophagie in $\Delta fis1^*$ beobachtet, der sich jedoch auf eine sekundäre Mutation zurückführen ließ. Insgesamt deuten die Ergebnisse sowohl der vorliegenden Studie als auch anderer Studien darauf hin, dass die Faktoren der mitochondrialen Teilungsmaschinerie nicht essenziell für Mitophagie sind. Die mitochondriale Teilung ist damit keine Voraussetzung für den Abbau von Mitochondrien über Mitophagie.

4.5 Der Einfluss der Morphologie auf Mitophagie ist in *Saccharomyces cerevisiae* und Säugern verschieden

Entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt die mitochondriale Morphologie in Hefe keinen direkten Einfluss auf Mitophagie. Das war unerwartet und stellt die zu Grunde liegende Hypothese der Qualitätskontrolle von Mitochondrien über ihre Dynamik in Frage. Jedoch ist noch immer nicht geklärt, wie die mitochondriale Teilung und Mitophagie induziert oder reguliert werden. Es ist möglich, dass unter normalen Wachstumsbedingungen der Abbau eines geringen Anteils der Mitochondrien durch Teilung induziert wird, ähnlich der Vorgänge, die in Säugerzellen beobachtet wurden (Twig et al., 2008). Ein so geringfügiges Ausmaß an Mitophagie wäre möglicherweise mit den hier gewählten Methoden nicht detektierbar. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter bestimmten Bedingungen die mitochondriale Teilung den Abbau dysfunktioneller Mitochondrien fördert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Hefe wurde in humanen Zellen eine Abhängigkeit der Mitophagie von DRP1, dem Säugerhomolog zu Dnm1, beobachtet (Twig et al., 2008; M. Frank persönliche Kommunikation). In diesen Studien wurde Mitophagie unter normalen Wachstumsbedingungen beobachtet (Twig et al., 2008) oder durch Substanzen induziert, welche gezielt die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen (M. Frank). Interessanterweise wurde unter letzteren Bedingungen keine unspezifische Autophagie beobachtet. Desweiteren wurde in einem Säugerzellmodell durch Nährstoffentzug nur nicht-selektive Autophagie induziert (Hailey et al., 2010). Mitophagie wurde unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Das könnte darauf hinweisen, dass der Abbau von Organellen und Zytoplasma in Säugern feiner reguliert ist. Insgesamt schließen die Ergebnisse dieser Studie nicht aus, dass die mitochondriale Morphologie wichtig für die Selektion dysfunktioneller Mitochondrien während des Wachstums ist oder eine Rolle bei der Signaltransduktion zur Induktion von Mitophagie spielt.

Da die mitochondriale Teilung in Hefe nicht notwendig für Mitophagie ist, stellt sich die Frage, wie Teile des mitochondrialen Netzwerkes durch Autophagosomen abgeschnürt werden können. Eine Studie von Kim et al. (2007) zeigte, dass die Teilung der Mitochondrien und die Bildung des Autophagosoms koordiniert ablaufen. Dabei könnte die mitochondriale Teilung durch Faktoren der Autophagie vermittelt werden. Kürzlich wurden Organell-spezifische Mitophagie-Rezeptoren in Bäckerhefe und humanen Zellen identifiziert. Dabei handelt es sich im Fall von Hefe um Atg32 (Kanki et al., 2009a; Okamoto et al., 2009) und in humanen Zellen um Nix (Novak et al., 2010). Die Interaktion

dieser Proteine mit Atg8 bzw. den homologen Proteinen in Säugern, LC3 und GABARAP, welche für die Bildung der Autophagosomen essenziell sind, könnte auf eine Rolle bei der Selektion dysfunktioneller Mitochondrien hinweisen. Es ist möglich, dass diese und andere Faktoren ebenfalls in der Abspaltung mitochondrialer Fragmente während der Sequestrierung durch Autophagosomen fungieren. In einer aktuellen Studie wurde desweiteren beobachtet, dass Mitochondrien Lipide zur Bildung von Autophagosomen bereitstellen (Hailey et al., 2010). Dieser Vorgang erfolgte direkt an der mitochondrialen Außenmembran. Obwohl sich diese Beobachtungen auf Bedingungen unter Nährstoffentzug während der nicht-selektiven Autophagie beschränken, ist nicht ausgeschlossen, dass sich diese Ergebnisse auf Mitophagie übertragen lassen. Möglicherweise erfolgt die Bildung des Autophagosoms während der Mitophagie direkt über die Abschnürung von Teilen der mitochondrialen Membran.

Anders betrachtet, könnte auch die Größe des mitochondrialen Netzwerks der Grund sein, weshalb die Teilung in Säugerzellen, jedoch nicht in Bäckerhefe, notwendig für Mitophagie ist. In Hefe könnten die Dimensionen der Tubuli klein genug sein, um von Autophagosomen sequestriert zu werden. Häufigere Zellteilungen könnten außerdem zur Erzeugung kleinerer Tubuli beitragen. Im Gegensatz dazu sind die Zellen im Säugetierorganismus deutlich größer und die Zellteilungsrate geringer oder sogar vollständig abwesend. In post-mitotischem Gewebe kann es zudem von größerer Bedeutung sein, den selektiven Abbau von dysfunktionellen Mitochondrien stärker zu regulieren.

4.6 Die Deletion von *FIS1* resultiert in der Akkumulation einer Mutation in *WHI2*

Die Untersuchungen zum Einfluss der mitochondrialen Teilungsfaktoren auf die Mitophagie in dieser Arbeit zeigten einen Effekt für $\Delta fis1^*$. Dieser Effekt konnte auf eine sekundäre Mutation im kodierenden Bereich für *WHI2* zurückgeführt werden. Eine Mutation in *WHI2* wurde zuvor in $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ der Euroscarf-Stammsammlung beschrieben (Cheng et al., 2008). In dem hier verwendeten $\Delta caf4$ -Stamm wurde dagegen keine Mutation gefunden, was konsistent mit den Ergebnissen für Mitophagie in diesem Stamm ist. Da die *WHI2*-Mutation zu einem Stopcodon nach nur wenigen Aminosäuren

führt, ist davon auszugehen, dass in den betroffenen Stämmen kein funktionelles Whi2 vorhanden ist. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Mutation als auch die Deletion von *WHI2* zu einer verminderten Anpassung des Zellzyklus an äußere Bedingungen führt, wie zum Beispiel die Limitierung von Nährstoffen (Cheng et al., 2008; Leadsham et al., 2009). Entsprechend zeigen die Stämme verstärktes Wachstum beim Übergang in die stationäre Phase und eine verlängerte chronologische Lebensdauer. Die Expression von Genen der Stressantwort durch Msn2 und Msn4 ist in $\Delta whi2$ ebenfalls vermindert (Kaida et al., 2002). Diese Anpassungsdefizite resultieren bei länger anhaltenden Stressbedingungen in einem verstärkten Absterben der Zellen und damit zu einer reduzierten Stresstoleranz (Fannjiang et al., 2004; Kitagaki et al., 2007; Leadsham et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit führte die Konstruktion neuer *fis1*-Deletionsstämmen im BY4742-Hintergrund unmittelbar zu einer erneuten Mutation in *WHI2*. Es liegt daher nahe, dass eine genetische Interaktion zwischen *FIS1* und *WHI2* vorliegt. Damit stellt sich die Frage, worin der Vorteil einer solchen Mutation in *fis1*-Deletionsstämmen liegt. In humanen Zellen wurde beobachtet, dass der Verlust von DRP1 zu einem reduzierten Membranpotenzial, erhöhter Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen, zum Verlust der mitochondrialen DNA und zur Reduktion der respiratorischen Aktivität führt (Parone et al., 2008). In Folge dessen wiesen die Zellen reduzierte Mengen an zellulärem ATP auf, was die Zellproliferation reduzierte und die Autophagie induzierte. Diese Effekte könnten entweder auf eine verminderte funktionelle Kapazität der Mitochondrien, bedingt durch die Morphologie, zurückzuführen sein oder auf fehlenden Abbau dysfunktioneller Mitochondrien über Mitophagie. Es ist daher unklar, inwiefern sich diese Beobachtungen auf *Saccharomyces cerevisiae* übertragen lassen. Zum einen ist Mitophagie in Hefe nicht von mitochondrialer Teilung abhängig und zum anderen wurde die *WHI2*-Mutation in dieser Arbeit nur in $\Delta fis1$ beobachtet, nicht jedoch in Deletionsstämmen aller anderen mitochondrialen Teilungsfaktoren. Es ist dennoch wahrscheinlich, dass die *WHI2*-Mutation ein Wachstumsdefizit in $\Delta fis1$ in Hefe kompensiert. In Übereinstimmung damit wurde im $\Delta fis1$ -Stamm ohne Whi2-Mutation eine höhere Frequenz des Auftretens von petit-Kolonien beobachtet (Cheng et al., 2008). Petit-Kolonien entstehen, wenn Zellen ihre mitochondriale DNA verlieren und in Folge dessen auf Fermentation zur ATP-Bereitstellung beschränkt sind, was zu einem verminderten Koloniewachstum nach Erschöpfung der Glukose-Vorräte führt. Sowohl Wildtyp als auch der $\Delta fis1$ -Stamm mit *WHI2*-Mutation zeigten ein reduziertes Auftreten von petit-Kolonien im Vergleich zu $\Delta fis1$ ohne Mutation. Das könnte darauf hinweisen, dass Fis1,

möglicherweise in Kombination mit Caf4, zusätzlich zur Morphologie die Zellatmungskapazität von Mitochondrien beeinflusst. Entsprechend der publizierten Daten zu einem Anpassungsdefizit an Stressbedingungen wäre die *WHI2*-Mutation von Vorteil, um den Wachstumsdefizit und die Bildung von petit-Kolonien in $\Delta fis1$ zu kompensieren. Andererseits zeigen Ergebnisse von Leadsham et al. (2009), dass Mitochondrien in $\Delta whi2$ eine anormale Morphologie, ein reduziertes Membranpotenzial und erhöhte ROS-Bildung aufweisen. Diese Beobachtungen beschränkten sich jedoch auf die Phase des *diauxischen shifts* und könnten damit auf das Anpassungsdefizit an wechselnde Wachstumsbedingungen und auf die reduzierte Mitophagie in diesem Stamm zurückzuführen sein. Das potentielle Wachstumsdefizit in $\Delta fis1$ könnte dementsprechend nur in der exponentiellen Wachstumsphase durch den Verlust der Whi2-Funktion kompensiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Mitophagie und Autophagie in Abwesenheit von Fis1 überaktiviert sind und dieser Effekt durch die *WHI2*-Mutation kompensiert wird. Weitere Arbeiten sind notwendig, um diese Hypothesen zu testen.

4.7 Whiskey2 beeinflusst die Induktion von Mitophagie und Autophagie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Whi2 als neuer Faktor für Mitophagie und nicht-selektive Autophagie identifiziert. Da dieser Effekt nur partiell ist, wurde er möglicherweise in vorherigen Screeningverfahren nach Faktoren der Autophagie in $\Delta whi2$ nicht detektiert. Es gibt derzeit keine Hinweise auf eine physische Interaktion von Whi2 mit Proteinen, die mechanistisch an der Autophagie beteiligt sind. Der Cvt-Transportweg zeigte in $\Delta whi2$ keine Beeinträchtigung. Das deutet insgesamt darauf hin, dass Whi2 nicht mechanistisch in selektiver oder nicht-selektiver Autophagie fungiert. Für Whi2 wurde kein Homolog im Säugetierorganismus gefunden und die Funktion ist bis heute noch weitreichend ungeklärt. Hypothesen stützen sich hauptsächlich auf Beobachtungen, die unter verschiedenen Bedingungen gemacht wurden. Zum einen wurde beim Übergang von der Fermentation zu Zellatmung in $\Delta whi2$ die Depolarisierung und Aggregation des Aktin-Zytoskeletts beobachtet (Leadsham et al., 2009). Ein funktionelles Zytoskelett ist außerdem notwendig für selektive Formen von Autophagie (Reggiori et al., 2005), was jedoch nur den Effekt auf Mitophagie erklären würde. Entsprechend wurde zunächst die Morphologie des Zytoskeletts während der Induktion von Autophagie und Mitophagie durch Rapamycin-

Behandlung analysiert. $\Delta whi2$ zeigte jedoch unter diesen Bedingungen ein normales Zytoskelett mit sichtbaren Aktin-Kabeln vergleichbar mit dem Kontrollstamm. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Mitophagie-Defekt auf ein gestörtes Zytoskelett zurückzuführen ist.

Desweiteren wurde die Deletion von *WHI2* mit einer verminderten generellen Stressantwort in Verbindung gebracht (Kaida et al., 2002). Diese Studie zeigte eine physische Interaktion von Whi2 mit Psr1 und dem Transkriptionsfaktor der generellen Stressantwort Msn2. Die Deletion von *WHI2* resultierte ebenso wie die Deletion von *PSR1* und *PSR2* in der Hyperphosphorylierung von Msn2 und einer reduzierten Expression von Genen, die einen regulatorischen STRE-Bereich in ihrem Promotor aufweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Whi2 die generelle Stressantwort über die Aktivität von Msn2 reguliert. Dabei fungiert Whi2 möglicherweise als Vermittler der Interaktion zwischen Psr1 und Msn2, wahrscheinlich um Msn2 zu dephosphorylieren. Da die generelle Stressantwort jedoch auch durch den PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird, kann man nicht ausschließen, dass Whi2 die Stressantwort auf diese Art beeinflusst (Gorner et al., 1998). Um den reduzierenden Effekt von Whi2 auf Auto- und Mitophagie über die generelle Stressantwort zu erklären, müsste diese für die Induktion von Autophagie bzw. Mitophagie notwendig sein. In dieser Arbeit konnte das nicht bestätigt werden. In $\Delta msn2$ und $\Delta msn4$ waren sowohl die Autophagie als auch die Mitophagie sogar um bis zu 50% erhöht. Das ist in Einklang damit, dass die Transkription von bekannten Autophagie-Faktoren nicht über Msn2 und Msn4 reguliert wird. Die Erhöhung der Autophagie und Mitophagie könnte damit erklärt werden, dass durch die Reduktion der Stressantwort mehr Kapazitäten der Zellen für die Autophagie genutzt werden können. Beispielsweise werden auch einige Faktoren der Autophagie, z. B. Atg8 und Atg14, durch Transkription reguliert. Bei Induktion von Autophagie erhöht sich die Expression von Atg8 durch einen unbekanntem Transkriptionsfaktor um das 8-fache und von Atg14 durch Gln3 um das 20-fache. Diese Erhöhung wird durch die Reduktion der STRE-regulierten Transkription über freie Kapazitäten der Transkriptions- und Translationsmaschinerie begünstigt und könnte zu einer erhöhten Autophagie führen. In $\Delta psr1$ konnte ein geringer, jedoch nicht signifikanter Effekt auf Mitophagie und kein Effekt auf Autophagie beobachtet werden. Das liegt möglicherweise an der redundanten Funktion von Psr1, welche durch Psr2 ersetzt werden kann. In Einklang damit wurde der Phänotyp von $\Delta whi2$ nur in einem $\Delta psr1\Delta psr2$ -Doppeldeletionsstamm beobachtet (Kaida et al., 2002). Obwohl dieses Ergebnis tendenziell

auf einen Einfluss von Psr1 hinweisen könnte, liefert es keinen eindeutigen Hinweis, ob der Zusammenhang zwischen Whi2 und Mitophagie bzw. Autophagie auf die Funktion von Psr1 zurückzuführen ist. Insgesamt sind die Effekte von Whi2 und der generellen Stressantwort auf Autophagie und Mitophagie gegensätzlich, was darauf hindeutet, dass Whi2 die Auto- und Mitophagie nicht positiv über die generelle Stressantwort reguliert.

Der beobachtete Phänotyp in $\Delta whi2$ wurde in der Studie von Leadsham et al. (2009) desweiteren auf eine Überaktivierung des Ras-cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs zurückgeführt. Da sich die PKA-Aktivität auch auf die Induktion der Autophagie auswirkt, könnte sich so der Effekt auf die Mitophagie erklären. Die Mechanismen zur Regulation von Autophagie durch TORC1 und PKA sind in Abbildung 44 dargestellt. PKA führt im aktiven Zustand zur Hyperphosphorylierung des Atg1-Kinasekomplexes, wodurch die Induktion der Autophagie inhibiert wird (Yang und Klionsky, 2009). Inwiefern Mitophagie von der PKA-Aktivität reguliert wird, ist jedoch nicht bekannt.

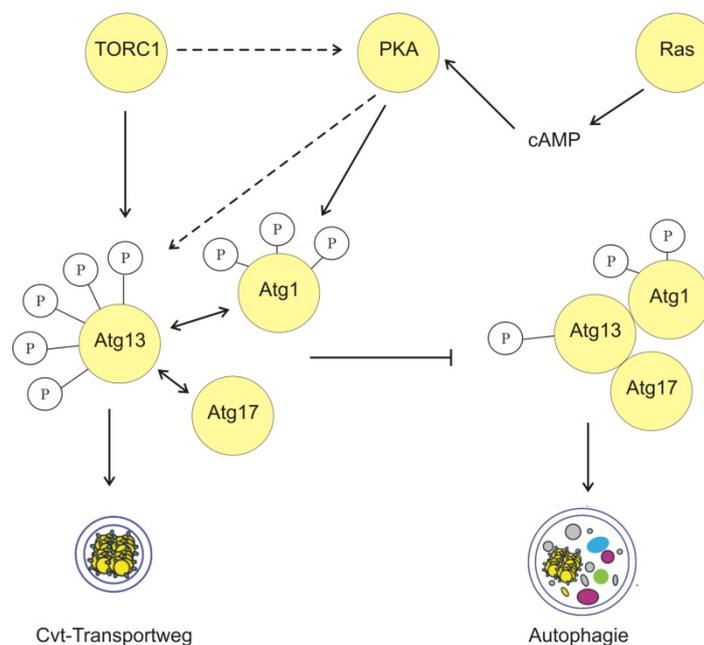


Abbildung 44: Regulierung der Autophagie durch TORC1 und PKA. Atg13 und Atg1 werden durch TORC1- und PKA-Aktivität hyperphosphoryliert. Dadurch wird die Bildung des Atg1-Kinasekomplexes inhibiert, welcher Autophagie induziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Mitophagie in Glukose-haltigem Medium inhibiert ist. Diese Inhibierung war jedoch nicht durch die Repression der mitochondrialen Biogenese bedingt, da die Inhibierung durch Deletion von *REG1* nicht aufgehoben wurde.

Da während der Fermentation die PKA-Aktivität gegenüber dem Übergang zur Zellatmung transient erhöht ist, könnte dieses Ergebnis auf einen Zusammenhang zwischen Mitophagie und PKA-Aktivität hinweisen. Zwar zeigte die Zugabe von extrazellulärem cAMP zur Kultur keinen Effekt auf die Mitophagie (Daten nicht gezeigt). Das könnte jedoch zum einen daran liegen, dass das extrazelluläre cAMP zu schnell durch die Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2 abgebaut wird und daher keine Wirkung zeigt. Zum anderen könnten lokale cAMP-Konzentrationen eine größere Rolle spielen, die durch externe Zugabe von cAMP experimentell nicht beeinflusst werden können. Beispielsweise wurde in $\Delta whi2$ die Misslokalisierung von Ras2 in der aktiven Form an Mitochondrien beobachtet, was die lokale cAMP-Konzentration erhöhen könnte (Leadsham et al., 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Glukose-Konzentration und die intrazelluläre cAMP-Konzentration nicht immer mit der PKA-Aktivität korrelieren (Ma et al., 1999; Vanhalewyn et al., 1999; Thevelein et al., 2000). Beispielsweise resultiert Stickstoffentzug in Glukose-haltigem Medium in einem Anstieg der cAMP-Konzentration, während die PKA-Aktivität reduziert wird. Die Bildung von cAMP über die Adenylatzyklase wird sowohl von Ras-Proteinen als auch von Gpa2 und dessen Rezeptor Gpr1 reguliert (Colombo et al., 1998; Xue et al., 1998). Die Regulation in Abhängigkeit von Glukose ist dabei eher auf Gpa2 und Gpr1 zurückzuführen ((Nakafuku et al., 1988; Kraakman et al., 1999). Die Rolle von Ras1/2 besteht wahrscheinlich in der Glukose-unabhängigen Regulierung des basalen cAMP-Gehalts. Desweiteren hängt die Aktivierung der Signalkaskade der PKA, welche durch den cAMP-Peak nach plötzlicher Glukose-Zufuhr in stationären Hefezellen induziert wird, von der Anwesenheit weiterer essenzieller Nährstoffe ab (Thevelein et al., 2000). Folglich muss es zusätzliche Faktoren geben, welche die Signalkaskade regulieren, die der PKA nachgelagert ist. Dafür wurde der FGM-Signalweg (*fermentable growth medium*) vorgeschlagen (Thevelein, 1994). In diesem Signalweg könnte möglicherweise die Protein-Kinase Sch9 eine Rolle spielen, welche über die Verfügbarkeit von Stickstoff reguliert wird. Diese Kinase weist homologe Bereiche zu PKA auf und ihre Überexpression kann die Deletion essenzieller Komponenten des Ras-cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs kompensieren. Die experimentelle Manipulation der Signaltransduktion um die PKA gestaltet sich entsprechend dieser Ergebnisse sehr schwierig. Desweiteren wirken sich Manipulationen auf mehrere Signale gleichzeitig aus. Die Mechanismen zur Regulation der Mitophagie durch den Ras-cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg, der Stressantwort und die Funktion von Whi2 sollten daher in

weiteren wissenschaftlichen Studien adressiert werden. Als Ausgangspunkt dafür wurden die möglichen Zusammenhänge zwischen Whi2 und der Induktion von Mitophagie und Autophagie im nachfolgenden Schema aufgezeigt (Abbildung 45). Whi2 könnte entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Induktion der Mitophagie und Autophagie zum einen über Dephosphorylierung und zum anderen über die Transkription gegensätzlich beeinflussen. Zum einen könnte es inhibierend über die Aktivierung der Stressantwort durch Msn2, zum anderen aktivierend über den Ras-cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg wirken. Die Inhibierung der PKA fördert die Dephosphorylierung von Atg13, wodurch sich der Atg1-Kinasekomplex zur Induktion von Autophagie bilden kann. Die Mitophagie könnte entweder über denselben Mechanismus bzw. die Induktion von Autophagie induziert werden oder durch einen weiteren noch unbekanntem Faktor. Dieser Faktor könnte entweder über Whi2 direkt, über Ras-cAMP-PKA oder auch über Psr1 und Psr2 reguliert werden. Entsprechend des stärkeren Effekts von Whi2 auf Mitophagie ist es ebenfalls denkbar, dass diese unabhängig von Autophagie nicht durch den Ras-cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird. Da sich die PKA-Aktivität auch inhibierend auf die generelle Stressantwort auswirkt, würden Mitophagie und Autophagie dadurch gleichzeitig begünstigt. Es ist desweiteren fraglich, ob Whi2 die Aktivität der PKA direkt, über cAMP und Ras1/2 oder über ein weiteres unbekanntes Protein reguliert. Beachtenswert in diesem Zusammenhang ist, dass die Proteinsequenz von Whi2 zwei Motive aufweist, die an der Aktivierung von Dephosphorylierungen beteiligt sind. Diese Strukturmerkmale, die Interaktion von Whi2 mit der Phosphatase Psr1 sowie der Einfluss auf die Aktivität der PKA weisen daraufhin, dass die Regulation mit hoher Wahrscheinlichkeit über Phosphorylierungsreaktionen erfolgt. Die Identifizierung von weiteren interagierenden Phosphatasen und ihrer Substrate sollte entsprechend Gegenstand nachfolgender Studien sein.

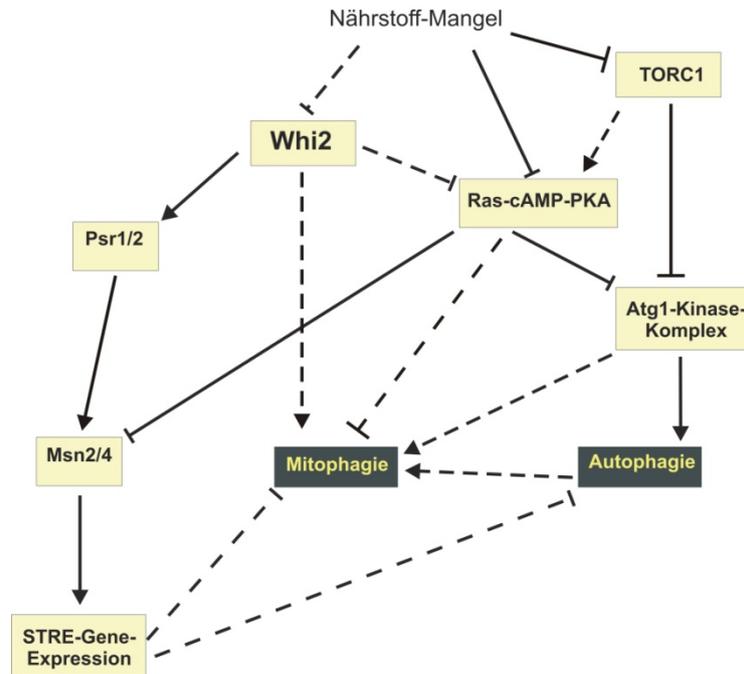


Abbildung 45: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen zum Einfluss von Whi2 auf Mitophagie und Autophagie. Whi2 induziert über die Interaktion mit Psr1/2 und Msn2/4 die Expression STRE-regulierter Gene. Die STRE-Gen Expression wirkt inhibierend auf die Induktion der Mitophagie und Autophagie. Whi2 inhibiert weiterhin direkt oder indirekt die Ras-cAMP-PKA-Signalkaskade. Aktivierte PKA phosphoryliert Atg1 und Atg13, wodurch die Bildung des Atg1-Kinasekomplexes verhindert und damit die Autophagie inhibiert wird. Dephosphoryliertes Atg13 induziert die Bildung des Atg1-Kinase-Komplexes wodurch Autophagie induziert wird. Die Induktion von Mitophagie könnte dabei direkt über die Aktivierung von Autophagie bzw. den Atg1-Kinasekomplex oder indirekt erfolgen. Dabei könnten weitere durch Whi2 regulierte Phosphorylierungen nötig sein. PKA wirkt ebenfalls inhibierend auf die Aktivität von Msn2/4. Durchgezogene Linien entsprechen etablierten Mechanismen. Gestrichelte Linien entsprechen möglichen Mechanismen.

5 Zusammenfassung

Mitochondrien bilden innerhalb der Zelle ein dynamisches Netzwerk aus, welches durch häufige Teilungs- und Fusionsvorgänge aufrechterhalten wird. Eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, unter anderem die autosomal dominante Optikusatrophie Typ1, Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A und 4A und Parkinson, werden mit einer Veränderung dieser mitochondrialen Dynamik in Verbindung gebracht. Obwohl die molekularen Mechanismen zur Teilung und Fusion von Mitochondrien zu einem Teil bereits aufgeklärt wurden, ist die Funktion der mitochondrialen Dynamik noch immer unklar. Eine Hypothese dazu ist, dass die Dynamik einer Art mitochondrialen Qualitätskontrolle dient. In Hefen und Säugern wurde beobachtet, dass die Fusionskompetenz von dysfunktionellen Mitochondrien reduziert ist. Auf diese Weise könnten dysfunktionelle Mitochondrien vom Netzwerk isoliert und dem Abbau durch Mitophagie zugeführt werden.

Um diese Hypothese zu prüfen, galt es zunächst, die Mitophagie näher zu charakterisieren. Dazu wurde eine enzymatische Methode etabliert, welche die quantitative Unterscheidung zwischen Autophagie und Mitophagie in *Saccharomyces cerevisiae* ermöglicht. Die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse wurden zusätzlich mit Fluoreszenzmikroskopie und der Analyse des Abbaus mitochondrialer Proteine mittels Westernblot verifiziert.

Die Inhibierung der TOR1-Kinase (*target of rapamycin 1*) durch Stickstoffentzug oder Rapamycin resultierte während des respiratorischen Wachstums in der Induktion von sowohl Autophagie als auch Mitophagie. Die Daten dieser Studie zeigten, dass Rapamycin-induzierte Mitophagie von den bekannten Faktoren der selektiven Autophagie (*ATG11*, *ATG20*, *ATG24*) abhängt. Damit handelt es sich unter den gewählten Bedingungen um einen selektiven Abbau von Mitochondrien. Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der mitochondrialen Dynamik auf Mitophagie untersucht. Dazu wurden Hefestämme, in denen entweder die Teilung oder die Fusion der Mitochondrien inhibiert war, analysiert. Die Fragmentierung der Mitochondrien in einem temperatursensitiven *mgm1*-Stamm oder die Behandlung mit Substanzen, welche die mitochondriale Funktion beeinträchtigen, führten nicht zu einer messbaren Induktion der Mitophagie. In Einklang damit resultierte die Rapamycin-induzierte Mitophagie nicht in einer Fragmentierung des

mitochondrialen Netzwerks. In Mutanten der mitochondrialen Teilung ($\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$, $\Delta caf4$) wurde Induktion von Mitophagie durch Rapamycin in gleicher Weise wie im Wildtyp beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dynamik und Mitophagie scheint demnach im Gegensatz zu Säugern in *S. cerevisiae* nicht vorzuliegen. Jedoch könnte die Teilung unter bestimmten Bedingungen notwendig sein, zum Beispiel für den Abbau von geschädigten Mitochondrien. Dies gilt es in zukünftigen Studien mit neuen Modellen der mitochondrialen Dysfunktion zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einem $\Delta fis1$ -Stamm zunächst eine Reduktion der Mitophagie und Autophagie festgestellt. Dieser Stamm wies jedoch eine sekundäre Mutation im Lokus des Gens *WHISKEY* (*WHI2*) auf. Die Expression von *WHI2*, aber nicht von *FISI*, konnte die Induktion der Mito- und Autophagie in $\Delta fis1$ rekonstituieren. Damit ist der Phänotyp auf die sekundäre Mutation und nicht auf die Inhibierung der mitochondrialen Teilung in diesem Stamm zurückzuführen. Die Analyse eines *whi2*-Deletionsstammes bestätigte, dass dieses Protein notwendig für die Induktion der Mitophagie, jedoch nicht für den Cvt-Transportweg (*cytoplasm to vacuole targeting pathway*) ist. Frühere Studien mit $\Delta whi2$ lieferten Indizien für Funktionen in der Regulierung des Zellzyklus und der generellen Stressantwort. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion der Transkriptionsfaktoren der generellen Stressantwort, *MSN2* und *MSN4*, in erhöhter Mitophagie und Autophagie resultiert. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die generelle Stressantwort an der Regulation von Autophagie und Mitophagie beteiligt ist. Außerdem berichten frühere Studien, dass die Deletion von *WHI2* zu einer Überaktivierung der Proteinkinase A und damit zur Inhibierung von Autophagie führt. Möglicherweise wird demnach die Regulation der *WHI2*-abhängigen Mitophagie sowohl über die allgemeine Stressantwort als auch über den Proteinkinase-A-Signaltransduktionsweg vermittelt.

6 Summary

Over the last two decades mitochondria have been recognized as a highly dynamic network constantly undergoing fusion and fission. Several diseases such as autosomal dominant optic atrophy type I, Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A and 4A and Parkinson's disease are associated with alterations in mitochondrial dynamics. Although there is considerable knowledge on the molecular players involved in fusion and fission of mitochondria, the functional significance of mitochondrial dynamics is still elusive. One hypothesis is that fusion and fission dynamics act as a quality checkpoint for mitochondrial functionality. Observations in yeast and mammalian cells showed that fusion competence is reduced if mitochondrial function is impaired. By that dysfunctional mitochondria could be isolated from the intact network and targeted for degradation by mitophagy.

In order to test this hypothesis and to characterize the process of mitophagy more closely, an enzymatic method was established which enabled the quantification of autophagy and mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. Results obtained by this method were further validated by fluorescence microscopy and analysis of mitochondrial protein degradation by western blot. Inhibition of the TOR1-Kinase (*target of rapamycin*) by nitrogen starvation or rapamycin treatment under respiring growth conditions resulted in the induction of autophagy as well as mitophagy. The data further shows that rapamycin-induced mitophagy depends on the known components of the selective autophagy machinery (*ATG11*, *ATG20*, *ATG24*), confirming that a selective degradation of mitochondria occurred under the applied conditions. The present study focused further on deciphering the role of mitochondrial dynamics in mitophagy in yeast. Therefore, mutants deficient in either fusion or fission of mitochondria were analyzed. Mitochondrial fragmentation in a temperature sensitive *mgm1-5* mutant or treatment with drugs that compromise mitochondrial functionality did not trigger a detectable induction of mitophagy. Accordingly, rapamycin-induced mitophagy does not result in the fragmentation of the mitochondrial network. In mutants inhibited for mitochondrial fission (Δ *dnm1*, Δ *fis1*, Δ *mdv1*, Δ *caf4*) mitophagy was induced at wild type level. Thus, in contrast to data obtained in mammalian systems there seems to be no link between mitochondrial dynamics and mitophagy in *S. cerevisiae*. However, fission could play an important role for the induction of mitophagy under other

conditions, for example to eliminate damaged mitochondria during exponential growth. This needs to be addressed in further studies with new model systems for mitochondrial dysfunction.

Within the present study a reduction in autophagy and mitophagy was initially observed in a $\Delta fis1$ strain. This strain, however, contained a secondary mutation in the locus of the gene *WHISKEY2* (*WHI2*). Expression of *WHI2*, but not *FIS1*, could restore mitophagy and autophagy to wild type level. The observed phenotype in this strain is therefore due to the secondary mutation and not due to the impaired fission. Analysis of $\Delta whi2$ confirmed that *Whi2* is required for mitophagy but not the cvt-pathway (*cytoplasm to vacuole targeting*). Results of previous studies in $\Delta whi2$ point to a function of *Whi2* in cell cycle regulation and the general stress response. In the present study it was observed that the deletion of the general stress response transcription factors, *MSN2* and *MSN4*, results in increased mitophagy and autophagy. This result indicates that the general stress response plays a role in the regulation of mitophagy and autophagy. Previous studies also reported, that deletion of *WHI2* leads to an increased protein kinase-A activity and thus to inhibition of autophagy. Possibly, *Whi2* regulates mitophagy via the general stress response as well as protein kinase-A signaling.

7 Literaturverzeichnis

- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G. *et al.* (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* **26**, 211-215.
- Ano, Y., Hattori, T., Kato, N. and Sakai, Y. (2005). Intracellular ATP correlates with mode of pexophagy in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 1527-1533.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **139**, 1687-1695.
- Beck, T. and Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**, 689-692.
- Bellu, A. R., Kram, A. M., Kiel, J. A., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J. (2001a). Glucose-induced and nitrogen-starvation-induced peroxisome degradation are distinct processes in *Hansenula polymorpha* that involve both common and unique genes. *FEMS Yeast Res* **1**, 23-31.
- Bellu, A. R., Komori, M., van der Klei, I. J., Kiel, J. A. and Veenhuis, M. (2001b). Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p. *J Biol Chem* **276**, 44570-44574.
- Bellu, A. R., Salomons, F. A., Kiel, J. A., Veenhuis, M. and Van Der Klei, I. J. (2002). Removal of Pex3p is an important initial stage in selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *J Biol Chem* **277**, 42875-42880.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27**, 198-219.
- Bevis, B. J. and Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**, 83-87.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bryant, N. J. and Stevens, T. H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 230-247.
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J. and Herman, P. K. (2004). The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 20663-20671.
- Camougrand, N., Kissova, I., Velours, G. and Manon, S. (2004). Uth1p: a yeast mitochondrial protein at the crossroads of stress, degradation and cell death. *FEMS Yeast Res* **5**, 133-140.
- Campbell, C. L. and Thorsness, P. E. (1998). Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci* **111** (Pt 16), 2455-2464.
- Caplan, A. J. and Douglas, M. G. (1991). Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J Cell Biol* **114**, 609-621.
- Carrera, A. C. (2004). TOR signaling in mammals. *J Cell Sci* **117**, 4615-4616.
- Cerveny, K. L. and Jensen, R. E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell* **14**, 4126-4139.
- Cheng, W. C., Teng, X., Park, H. K., Tucker, C. M., Dunham, M. J. and Hardwick, J. M. (2008). Fis1 deficiency selects for compensatory mutations responsible for cell death and growth control defects. *Cell death and differentiation* **15**, 1838-1846.
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J. H., Gorwa, M. F., Colavizza, D. *et al.* (1998). Involvement of

distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**, 3326-3341.

Coonrod, E. M., Karren, M. A. and Shaw, J. M. (2007). Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic* **8**, 500-511.

Cowles, C. R., Snyder, W. B., Burd, C. G. and Emr, S. D. (1997). Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J* **16**, 2769-2782.

Daum, G., Bohni, P. C. and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 13028-13033.

De Virgilio, C. and Loewith, R. (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**, 6392-6415.

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E. et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207-210.

DeVay, R. M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L. L., Hoppins, S., Stahlberg, H. and Nunnari, J. (2009). Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol* **186**, 793-803.

Dohm, J. A., Lee, S. J., Hardwick, J. M., Hill, R. B. and Gittis, A. G. (2004). Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins* **54**, 153-156.

Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M. F., Attardi, G., Larsson, N. G. et al. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* **281**, 37972-37979.

Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 469-486.

Estruch, F. and Carlson, M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 3872-3881.

Fannjiang, Y., Cheng, W. C., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., Hill, R. B., Basanez, G. and Hardwick, J. M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* **18**, 2785-2797.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515-525.

Frazier, A. E., Taylor, R. D., Mick, D. U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Guiard, B. and Rehling, P. (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* **172**, 553-564.

Frey, T. G. and Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**, 319-324.

Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. and Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* **152**, 683-692.

Geisler, S., Holmstrom, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J. and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**, 119-131.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.

Glick, B. S., Beasley, E. M. and Schatz, G. (1992). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem Sci* **17**, 453-459.

Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. and Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**, 586-597.

- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Griffin, E. E., Graumann, J. and Chan, D. C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 237-248.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T. K. and Deschenes, R. J. (1993). Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Curr Genet* **24**, 141-148.
- Gunkel, K., van der Klei, I. J., Barth, G. and Veenhuis, M. (1999). Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after a shift of cells from acetate/oleate/ethylamine into glucose/ammonium sulfate-containing media. *FEBS Lett* **451**, 1-4.
- Haas, A. (1995). A quantitative assay to measure homotypic vacuole fusion in vitro. *Methods in Cell Science* **17**, 283-294.
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-667.
- Hales, K. G. and Fuller, M. T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* **90**, 121-129.
- Hamasaki, M., Noda, T., Baba, M. and Ohsumi, Y. (2005). Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic* **6**, 56-65.
- Harding, T. M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M. and Klionsky, D. J. (1996). Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Biol Chem* **271**, 17621-17624.
- He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., Yen, W. L., Legakis, J. E. and Klionsky, D. J. (2006). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J Cell Biol* **175**, 925-935.
- Hell, K., Neupert, W. and Stuart, R. A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* **20**, 1281-1288.
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R. A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2250-2255.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. and Reichert, A. S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* **278**, 27781-27788.
- Herlan, M., Bornhovd, C., Hell, K., Neupert, W. and Reichert, A. S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol* **165**, 167-173.
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* **143**, 359-373.
- Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 483-519.
- Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 751-780.
- Hutchins, M. U. and Klionsky, D. J. (2001). Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 20491-20498.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M. *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492.
- Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y. and Guan, K. L. (2005). Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 79-100.
- Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* **117**, 6535-6546.

- Jacinto, E. and Lorberg, A.** (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* **410**, 19-37.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A. C., Egner, A., Westermann, B. and Hell, S. W.** (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* **116**, 2005-2014.
- Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M. and Ohsumi, Y.** (2005). Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell* **16**, 2544-2553.
- Kaida, D., Yashiroda, H., Toh-e, A. and Kikuchi, Y.** (2002). Yeast Whi2 and Psr1-phosphatase form a complex and regulate STRE-mediated gene expression. *Genes Cells* **7**, 543-552.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y.** (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**, 1507-1513.
- Kanki, T. and Klionsky, D. J.** (2008). Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J Biol Chem* **283**, 32386-32393.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. and Klionsky, D. J.** (2009a). Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* **17**, 98-109.
- Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C. R., Lynch-Day, M. A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W. L. et al.** (2009b). A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol Biol Cell* **20**, 4730-4738.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. and Ohsumi, Y.** (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **152**, 519-530.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. and Lemasters, J. J.** (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics* **462**, 245-253.
- Kim, J., Scott, S. V., Oda, M. N. and Klionsky, D. J.** (1997). Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* **137**, 609-618.
- Kim, J., Huang, W. P., Stromhaug, P. E. and Klionsky, D. J.** (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem* **277**, 763-773.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**, 263-276.
- Kitagaki, H., Araki, Y., Funato, K. and Shimoi, H.** (2007). Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett* **581**, 2935-2942.
- Klionsky, D. J.** (1997). Protein transport from the cytoplasm into the vacuole. *J Membr Biol* **157**, 105-115.
- Kobayashi, N. and McEntee, K.** (1993). Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 248-256.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H. and Thevelein, J. M.** (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**, 1002-1012.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. and Ohsumi, Y.** (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**, 18619-18625.
- Kvam, E. and Goldfarb, D. S.** (2004). Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **117**, 4959-4968.
- Kvam, E., Gable, K., Dunn, T. M. and Goldfarb, D. S.** (2005). Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: a role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles. *Mol Biol Cell* **16**, 3987-3998.
- Lackner, L. L. and Nunnari, J. M.** (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 1138-1144.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leadsham, J. E., Miller, K., Ayscough, K. R., Colombo, S., Martegani, E., Sudbery, P. and Gourlay, C. W.** (2009). Whi2p links nutritional sensing to actin-dependent Ras-cAMP-PKA regulation and apoptosis in yeast. *J Cell Sci* **122**, 706-715.
- Levine, B. and Klionsky, D. J.** (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-477.
- Levine, B. and Deretic, V.** (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767-777.
- Levine, B. and Kroemer, G.** (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
- Li, S. C. and Kane, P. M.** (2009). The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 650-663.
- Lill, R. and Kispal, G.** (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**, 352-356.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. and Hall, M. N.** (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**, 457-468.
- Lyamzaev, K. G., Pletjushkina, O. Y., Saprunova, V. B., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V. and Skulachev, V. P.** (2004). Selective elimination of mitochondria from living cells induced by inhibitors of bioenergetic functions. *Biochem Soc Trans* **32**, 1070-1071.
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M.** (1999). The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell* **10**, 91-104.
- Mannella, C. A., Marko, M. and Buttle, K.** (1997). Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci* **22**, 37-38.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G. and Ruis, H.** (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* **12**, 1997-2003.
- Margulis, L.** (1971). Symbiosis and evolution. *Sci Am* **225**, 48-57.
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F.** (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**, 2227-2235.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J. M.** (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059-1069.
- Miller, J. F., Dower, W. J. and Tompkins, L. S.** (1988). High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 856-860.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
- Monastyrska, I., He, C., Geng, J., Hoppe, A. D., Li, Z. and Klionsky, D. J.** (2008). Arp2 links autophagic machinery with the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **19**, 1962-1975.
- Mountain, H. A. and Sudbery, P. E.** (1990a). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* WHI2 gene. *J Gen Microbiol* **136**, 727-732.
- Mountain, H. A. and Sudbery, P. E.** (1990b). The relationship of growth rate and catabolite repression with WHI2 expression and cell size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **136**, 733-737.
- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. and Shaw, J. M.** (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* **151**, 367-380.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I. and Hayashi, J. I.** (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* **7**, 934-940.

- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K., Matsumoto, K. and Kaziro, Y. (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1374-1378.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. and Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**, 795-803.
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R. and Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **8**, e1000298.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**, 863-917.
- Nice, D. C., Sato, T. K., Stromhaug, P. E., Emr, S. D. and Klionsky, D. J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem* **277**, 30198-30207.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* **170**, 1067-1078.
- Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* **273**, 3963-3966.
- Noda, T., Matsuura, A., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1995). Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 126-132.
- Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* **148**, 465-480.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Lohr, F., Popovic, D., Occhipinti, A. et al. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**, 45-51.
- Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R. J. and Schweyen, R. J. (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, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W. and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* **8**, 1233-1242.
- Okamoto, K. and Shaw, J. M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* **39**, 503-536.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. and Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* **17**, 87-97.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. and Hayashi, J. I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* **28**, 272-275.
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W. and Shaw, J. M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* **143**, 333-349.
- Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., Kvam, E., Shulga, N., Huang, K., Lemmon, S. and Goldfarb, D. S. (2000). Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell* **11**, 2445-2457.
- Parone, P. A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D. I., Maechler, P., Barja, F. and Martinou, J. C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* **3**, e3257.
- Paschen, S. A., Neupert, W. and Rapaport, D. (2005). Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **30**, 575-582.

- Piper, R. C., Bryant, N. J. and Stevens, T. H.** (1997). The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol* **138**, 531-545.
- Piper, R. C., Cooper, A. A., Yang, H. and Stevens, T. H.** (1995). VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **131**, 603-617.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F. M., di Rago, J. P. and Martinou, J. C.** (2005). Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell death and differentiation* **12**, 1613-1621.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D. G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M. E., Moore, R. J., Gritsenko, M. A., Kozany, C. et al.** (2004). Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* **2**, e160.
- Radcliffe, P., Trevethick, J., Tyers, M. and Sudbery, P.** (1997). Deregulation of CLN1 and CLN2 in the *Saccharomyces cerevisiae* whi2 mutant. *Yeast* **13**, 707-715.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B.** (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 20150-20155.
- Reggiori, F., Monastyrska, I., Shintani, T. and Klionsky, D. J.** (2005). The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**, 5843-5856.
- Rojo, E. E., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R. A.** (1998). Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J Biol Chem* **273**, 8040-8047.
- Rose, M. D., Winston, F., Hieter, P.** (1990). Methods in Yeast Genetics. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Ryan, M. T., Wagner, R. and Pfanner, N.** (2000). The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 13-21.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I. J. and Kiel, J. A.** (2006). Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1767-1775.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prchal, J. T., Chen, M. and Wang, J.** (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**, 232-235.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Santel, A. and Fuller, M. T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-874.
- Saraste, M.** (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488-1493.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M.** (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**, 1296-1302.
- Sattler, T. and Mayer, A.** (2000). Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation. *J Cell Biol* **151**, 529-538.
- Saul, D. J. and Sudbery, P. E.** (1985). Molecular cloning of WHI2, a gene involved in the regulation of cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **131**, 1797-1806.
- Schauss, A. C., Bewersdorf, J. and Jakobs, S.** (2006). Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J Cell Sci* **119**, 3098-3106.

- Scheffler, I. E.** (1999). Mitochondria. In *Wiley-Liss*.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E. and Hall, M. N.** (2004). Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* **24**, 338-351.
- Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L. et al.** (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19500-19505.
- Scott, S. V., Guan, J., Hutchins, M. U., Kim, J. and Klionsky, D. J.** (2001). Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* **7**, 1131-1141.
- Sesaki, H. and Jensen, R. E.** (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* **152**, 1123-1134.
- Sesaki, H. and Jensen, R. E.** (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* **279**, 28298-28303.
- Sever, S., Muhlberg, A. B. and Schmid, S. L.** (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.
- Shepard, K. A. and Yaffe, M. P.** (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol* **144**, 711-720.
- Sherman, F.** (1991). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **194**, 3-21.
- Shintani, T., Huang, W. P., Stromhaug, P. E. and Klionsky, D. J.** (2002). Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell* **3**, 825-837.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfish, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B. et al.** (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13207-13212.
- Sikorski, R. S. and 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.
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M.** (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**, 582-585.
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Newman-Smith, E. D., Pishvae, B. and van der Bliek, A. M.** (1999). A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J Biol Chem* **274**, 14942-14947.
- Stack, J. H., DeWald, D. B., Takegawa, K. and Emr, S. D.** (1995). Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol* **129**, 321-334.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J. and Herman, P. K.** (2010). The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **6**, 294-295.
- Stepp, J. D., Huang, K. and Lemmon, S. K.** (1997). The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. *J Cell Biol* **139**, 1761-1774.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* **20**, 5971-5981.
- Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N. and Youle, R. J.** (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* **280**, 21444-21452.
- Suzuki, M., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Youle, R. J. and Tjandra, N.** (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* **334**, 445-458.
- Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionsky, D. J. and Abeliovich, H.** (2007). Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J Biol Chem* **282**, 5617-5624.
- Tate, J. J., Georis, I., Feller, A., Dubois, E. and Cooper, T. G.** (2009). Rapamycin-induced Gln3 dephosphorylation is insufficient for nuclear localization: Sit4 and PP2A phosphatases are regulated and function differently. *J Biol Chem* **284**, 2522-2534.

- Thevelein, J. M.** (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**, 1753-1790.
- Thevelein, J. M. and de Winder, J. H.** (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**, 904-918.
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winder, J. H., Donath, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D. et al.** (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb Technol* **26**, 819-825.
- Tieu, Q. and Nunnari, J.** (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* **151**, 353-366.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C. et al.** (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* **28**, 1589-1600.
- Torres, J., Di Como, C. J., Herrero, E. and De La Torre-Ruiz, M. A.** (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* **277**, 43495-43504.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.
- Treger, J. M., Magee, T. R. and McEntee, K.** (1998). Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 13-19.
- Tu, J. and Carlson, M.** (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**, 5939-5946.
- Tuttle, D. L., Lewin, A. S. and Dunn, W. A., Jr.** (1993). Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur J Cell Biol* **60**, 283-290.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G. et al.** (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433-446.
- Uttenweiler, A., Schwarz, H., Neumann, H. and Mayer, A.** (2007). The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. *Mol Biol Cell* **18**, 166-175.
- van der Bliek, A. M.** (1999). Is dynamin a regular motor or a master regulator? *Trends Cell Biol* **9**, 253-254.
- Vanhalewyn, M., Dumortier, F., Debast, G., Colombo, S., Ma, P., Winderickx, J., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M.** (1999). A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, Cyr1K1876M, specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signalling and not the basal cAMP level. *Mol Microbiol* **33**, 363-376.
- Veenhuis, M., Douma, A., Harder, W. and Osumi, M.** (1983). Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch Microbiol* **134**, 193-203.
- Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D. Y.** (1987). A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.
- Vogel, F., Bornhvd, C., Neupert, W. and Reichert, A. S.** (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* **175**, 237-247.
- Waizenegger, T., Habib, S. J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S. A., Hell, K., Neupert, W. and Rapaport, D.** (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* **5**, 704-709.
- Wang, C. W. and Klionsky, D. J.** (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* **9**, 65-76.
- Westermann, B.** (2009). Mitochondrial dynamics in model organisms: What yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria. *Semin Cell Dev Biol*.
- Westermann, B. and Neupert, W.** (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1421-1427.

- Wickner, W.** (2002). Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *EMBO J* **21**, 1241-1247.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. and Nunnari, J.** (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* **151**, 341-352.
- Xue, Y., Batlle, M. and Hirsch, J. P.** (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* **17**, 1996-2007.
- Yaffe, M. P. and Schatz, G.** (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4819-4823.
- Yang, Z. and Klionsky, D. J.** (2007). Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. *Autophagy* **3**, 149-150.
- Yang, Z. and Klionsky, D. J.** (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**, 1-32.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J.** (2005). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell* **16**, 1593-1605.
- Zick, M. and Reichert, A. S.** (2010). Mitochondria in cellular domains. New York: John Wiley & Sons.
- Zick, M., Duvezin-Caubet, S., Schafer, A., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A. S.** (2009). Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett* **583**, 2237-2243.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J. et al.** (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* **36**, 449-451.

Im Rahmen dieser Arbeit entstand folgende Veröffentlichung:

- Mendl, N., Occipinti, A., Müller, M., Wild, P., Dikic, I., Reichert, A. S.** (2011). Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene *WHI2*. *J Cell Sci* **124**, 1339-1350.

8 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ALP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
Cvt	<i>Cytoplasm to vacuole targeting</i>
DIK	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung
GED	GTPase Effektor Domäne
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HMW	<i>High molecular weight marker</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MTBS	5% Milch in Tris-gepufferter Saline
MBP	Maltose-bindendes Protein
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
n	Anzahl der Durchführungen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	<i>Phagophore assembly site</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pi	anorganisches Phosphat
PIPES	1,4'-Piperazin-N,N'-Diethansulfonsäure
PKA	Proteinkinase A

PMN	<i>Piecemeal microautophagy of the nucleus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdIns	Phosphatidyl-Inositol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
TPR	<i>Tetratricopeptid repeat</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut anzufertigen. Seine Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit waren mir vor allem gegen Ende eine große Hilfe. Darüber hinaus habe ich dank seiner stets konstruktiven Kritik sehr viel über das wissenschaftliche Arbeiten gelernt.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll danke ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor dem Fachbereich Biologie zu vertreten.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Andreas Reichert für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Sein Ideenreichtum und Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Denk- und Herangehensweisen waren jederzeit eine Inspiration für mich. Dank der Freiheiten bezüglich der Bearbeitung meines Projektes wurde mein wissenschaftliches Interesse stets angeregt. Die gute Atmosphäre in seiner Gruppe und die stetige Unterstützung seinerseits, nicht nur im Bereich der Wissenschaft, trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Christiane Kotthoff für die engagierte Unterstützung bei der Bearbeitung des Projekts und ihre Freundschaft. Sie hat erheblich zu meinem Durchhaltevermögen in der schwierigsten Phase beigetragen. Desweiteren danke ich Iris Haag, Gabriele Ludwig, Ulrike Wirth, Simone Grau und Ilona Dietze für ihre technische Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit. Angelo Occhipinti danke ich für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Reichert für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, die stetige Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Unterstützung. Vor allem Regina und Anja haben mir den Anfang sehr erleichtert und ich danke Ihnen für ihre Freundschaft über das Labor hinaus. Stephane Duvezin-Caubet, Priv. Doz. Dr. Kai Hell und Dr. Dejana Mocranjac danke ich für die wertvollen Anregungen und konstruktive Kritik zur Bearbeitung meines Projektes.

Allen anderen Mitgliedern des „Neupert-Labors“ danke ich für die allzeit gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, vor allem Bernadette Schreiner und Nikola Messecke für eine gute Zeit trotz fehlender Arbeitsgruppe am Ende. Christine Werner danke ich für die moralische Unterstützung bei der Führung der Tierhaltung und bei verwaltungstechnischen Angelegenheiten. Frau Hauck gilt ebenfalls dieser Dank. Den Mitarbeitern der Werkstatt, der Tierhaltung und den Spülfrauen danke ich dafür, dass immer alles zur Verfügung stand, was man zum Arbeiten braucht. Ich bedanke mich weiterhin bei jenen, die mir Antikörper, Plasmide und Hefestämme zur Verfügung gestellt haben.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden, Sandra, Nadja, Thilo, Nadine und Stefan, die mich immer wieder daran erinnern haben, dass die Arbeit nicht das einzig Wichtige ist und mich bei vielen Unternehmungen abgelenkt haben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie für den Glauben an mich und die stetige Unterstützung auf meinem Weg und während meiner Ausbildung. Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Mann Christian, der mich jederzeit emotional und finanziell unterstützt hat. Seine Liebe, Geduld und sein Verständnis haben mir die Kraft gegeben, diese Arbeit fertigzustellen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Nadine Mendl, geb. Rehn
Geburtsdatum	27.12.1978
Geburtsort	Rochlitz

Schulbildung:

1985-1991	Grund- und Polytechnische Oberschule Ernst-Thälmann, Rochlitz
1991-1997	Johann-Matthäsius-Gymnasium, Rochlitz
1997	Abitur, Johann-Matthäsius-Gymnasium, Rochlitz

Hochschulbildung:

10/1997 – 07/2001	Studium der Lebensmittelchemie, Technische Universität Dresden
08/2001 – 06/2002	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU Dresden (Prof. Thomas Henle), Anleitung durch Dr. Uwe Schwarzenboltz
06/2002	Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemikerin
seit 03/2006	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU München

Berufserfahrung:

07/2002 – 02/2006	Tätigkeit als Lebensmittelchemikerin bei Kraft Foods, Forschung und Entwicklung, Banbury, Großbritannien
-------------------	--