

Berichte aus der Biochemie

**Monika Bredschneider**

**Elektronenmikroskopische Studien  
zur Autophagocytose in der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae***

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag  
Aachen 1999

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Bredschneider, Monika:*

Elektronenmikroskopische Studien zur Autophagocytose in der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae* / Monika Bredschneider.

- Als Ms. gedr. - Aachen : Shaker, 1999

(Berichte aus der Biochemie)

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 1999

ISBN 3-8265-6780-3

Copyright Shaker Verlag 1999

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-6780-3

ISSN 1434-5536

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteolyse, d.h. der Abbau von Proteinen ist ein lebensnotwendiger Prozeß. Gemeinsam mit der Proteinsynthese ermöglicht sie es der Zelle, sich optimal an veränderte Umweltbedingungen anzupassen, sowie für sie schädliche Proteine abzubauen.

Hauptort der Proteolyse in eukaryotischen Organismen ist neben dem Proteasom das Lysosom. Diesem entspricht in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* die Vakuole. Die zum Abbau bestimmten Proteine werden in die Vakuole transportiert und dort von verschiedenen Endo-, Carboxy- und Aminopeptidasen abgebaut.

Unter Hungerungsbedingungen werden verschiedene cytoplasmatische Proteine durch Autophagocytose mit gleicher Geschwindigkeit in enzymatisch aktiver Form in die Vakuole transportiert und dort abgebaut. Dieser offensichtlich unselektiv ablaufende Prozeß führt bei gestörter vakuolärer Proteolyse zu einer Anreicherung autophagischer Vesikel in der Vakuole.

Zur Lokalisation des für die Autophagocytose essentiellen Aut3 Proteins wurde das funktionelle Fusionsprotein GFP-Aut3 hergestellt und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Während das Fusionsprotein im logarithmischen Wachstumsstadium nahezu ausschließlich im Cytosol zu finden ist, läßt es sich nach Hungerung in der Vakuole nachweisen. Um festzustellen, an welchem Schritt des autophagischen Weges Aut3p beteiligt ist, wurde eine *aut1 aut3*-Doppeldeletionsmutante hergestellt. Durch Zellfraktionierungsexperimente war bekannt, daß sich unter Hungerungsbedingungen in *aut1*-Deletionsstämmen Vesikel mit cytoplasmatischem Inhalt im Cytosol anreichern. Bei Zellfraktionierungsexperimenten von *aut3* und der *aut1 aut3*- Doppeldeletionsmutante unter den selben Bedingungen ließen sich keine Vesikel nachweisen. Dies ist ein Hinweis, daß Aut3p an der Biogenese autophagischer Vesikel beteiligt ist. Mittels „Two-Hybrid“ Experimenten wurde versucht, Proteine zu identifizieren, die mit Aut3 interagieren. Die bisher untersuchten Proteine Aut1, Aut7, Aut9, Tub1 und Tub2 scheinen jedoch nicht mit Aut3p wechselzuwirken.

In detaillierten elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollten die Phänotypen der vorhandenen Autophagocytosemutantenstämme sowie der Vorgang der Autophagocytose genauer untersucht werden. Ein besonderer Phänotyp zeigt der *aut6-1*-Mutantenstamm, der abnorme mitochondrielle Strukturen aufweist.

Einige Beobachtungen an Ultradünnschnitten unterschiedlicher Mutantenzellen deuten darauf hin, daß die Bildung der Autophagosomen in Bereichen des kernnahen endoplasmatischen Retikulums oder sogar direkt an der Kernmembran bzw. dem perinuklearen Raum erfolgt.

Der Einfluß der Lipidsynthese auf die Bildung und das anschließende Abknospen von Vesikeln wurde untersucht. In Zellen mit gestörtem Lipidstoffwechsel wurde beobachtet, daß sich Vesikel im Lumen der Kernmembran sowie zwischen der Zellmembran und Zellwand anhäufen.

Die mögliche Entstehung von Autophagosomen in Bereichen der Plasmamembran wird durch Beobachtungen an den Mutanten *cvt2-1*, *cvt3-1* und *cvt5-1* bekräftigt, in deren Zellen sich nach 3-5 stündiger Hungerung Membranschlingen an der Plasmamembran beobachten ließen. In Stämmen, in welchen die Gene *AUT1*, *AUT2*, *AUT7* oder *AUT9* deletiert waren, gelang der Nachweis von teilweise vermehrt auftretenden Autophagosomen, was zusammen mit den biochemisch gefundenen Eigenschaften dieser Gene und ihrer Produkte (Schlumpberger, 1996, Lang, 1998, Straub, 1998) auf eine Beteiligung am Transport von Autophagosomen hinweist. Aus der *aut1*-Deletionsmutante isolierte Autophagosomen konnten bezüglich ihrer Größe (180-240 nm) und Membran, einer Doppelmembran, elektronenmikroskopisch charakterisiert werden.

Weiterhin konnte ein Unterschied der sich in den Vakuolen von *aut4* und *aut5* Deletionsstämmen anreichernden Vesikel beobachtet werden. Bei den schon lichtmikroskopisch in der Vakuole gehungernerter  $\Delta aut4$ ,  $\Delta aut5$  und  $\Delta aut4 \Delta aut5$  Mutanten beobachteten Vesikel wurde eine mutantenspezifische strukturelle Besonderheit beobachtet: *aut4* defiziente Zellen weisen vorwiegend relativ große, von einer Einfachmembran begrenzte autophagische Vesikel (V1) auf, während sich bei der Deletion des *AUT5*-Gens zusätzlich Vesikel mit einer Doppelmembran (V2) beobachten lassen, die sich in der Regel im Inneren von einlagigen V1-Vesikeln befinden. Diese, in V1-Vesikel verpackten doppelagigen V2-Vesikel, lassen sich auch in proteinasedefizienten und *cvt17-1* Mutantensämmen, sowie in mit PMSF gehungerten Wildtypzellen beobachten. Antikörpermarkierungen an Ultradünnschnitten mit dem cytosolischen Marker FAS zeigten, daß der Inhalt der V1- und der V2-Strukturen cytosolischer Natur ist.

Zusätzlich zu dem in *Saccharomyces cerevisiae* schon bekannten autophagischen Vesikelaufnahmemechanismus, der Makroautophagocytose, wurden Hinweise auf weitere, durch Mikroautophagocytose vermittelte Aufnahmemechanismen gefunden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden weitere Modelle für den autophagischen Importprozeß in *Saccharomyces cerevisiae* vorgeschlagen: die Mikroautophagocytose und die Autopino-

cytose, durch die Vesikel und Kernbereiche über einen mikroautophagischen Mechanismus in die Vakuole aufgenommen werden können.

Bei statistischen Untersuchungen proteinasedefizienter Zellen konnten morphologisch vier Arten zellulärer Vesikel unterschieden werden: kleine Vs-Vesikel mit einem Durchmesser von 30-80 nm wurden vor allem nach längeren Hungerungszeiten im Cytosol von Import gestörten Stämmen und in der Vakuole von Stämmen mit defekten Lyseeigenschaften beobachtet. Größere Vesikel mit einer Doppelmembran konnten im Cytosol (V<sub>cyt</sub>, Ø=100-480 nm) und in der Vakuole (V<sub>2</sub>; Ø=100-400 nm) beobachtet werden. Vakuoläre Vesikel mit einer Einfachmembran (V<sub>1</sub>) wurden in einem Größenspektrum von 200-700 nm beobachtet. Außerdem wurden vergleichende statistische Untersuchungen zur Zell- und Vakuolengröße von Wildtypzellen, der *aut2*-Deletionsmutante und verschiedenen proteinasedefizienten Stämmen bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen angestellt. Dabei scheint die Autophagocytose bei Hungerung eine Vergrößerung des Vakuolenvolumens zu verursachen. Berechnungen, die auf statistisch ermittelten Daten basieren, ergaben, daß während einer 24-stündigen Hungerung etwa 40 V<sub>1</sub>- und 23 V<sub>2</sub>-Vesikel in die Vakuole gelangen.