

**Charakterisierung pathophysiologischer  
Wechselwirkungen zwischen dem neurotoxischen Protein  
TDP-43 und den proteolytischen Prozessen in  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
- Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) -  
der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und  
Naturwissenschaften (BayNAT)  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Christine Leibiger**

aus Erfurt

Erfurt

2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2012 bis Dezember 2017 in Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter Betreuung von Herrn PD Dr. Ralf Braun angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 02.02.2018

Zulassung durch das Leitungsgremium: 09.02.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 29.06.2018

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

PD Dr. Ralf Braun (Gutachter)

Prof. Dr. Klaus Ersfeld (Gutachter)

Prof. Dr. Angelika Muströph (Vorsitz)

Prof. Dr. Stefan Heidmann





## Für meine Mum,

die mich so kennt und liebt wie in „Lieblingsmensch“ von Namika beschrieben

Manchmal fühl ich mich hier falsch  
wie ein Segelschiff im All.

...

Auch wenn ich schweig', du weißt Bescheid.  
Ich brauch gar nichts sagen, ein Blick reicht.  
Und wird uns der Alltag hier zu grau,  
pack' ich dich ein, wir sind dann mal raus!

...

Absolut niemand darf's erfahren,  
aber dir vertrau ich's an,  
weil du's sicher aufbewahrst:  
meine Area 51.

...

Mach ich dir was vor, fällt's dir sofort auf.  
Lass ich mich hängen, dann baust du mich auf.  
Manchmal wiegt der Alltag schwer wie Blei,  
doch sind wir zu zweit, scheint alles so leicht.

...

Hallo, Lieblingsmensch!  
Ein Riesenkompiment dafür, dass du mich so gut kennst.  
Bei dir kann ich ich sein,  
verträumt und verrückt sein,  
na na na na na - **danke, Lieblingsmensch!**  
**Schön, dass wir uns kennen.**



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	xi
Zusammenfassung .....	xvii
Summary .....	xviii
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Klassifikation und Definition der Motoneuronerkrankungen.....	1
1.2 Das TAR DNA-bindende Protein TDP-43 .....	8
1.2.1 Physiologisches Vorkommen von TDP-43.....	8
1.2.2 Aufbau und Funktion von TDP-43 .....	9
1.2.3 Bedeutung der posttranslationalen Modifikation bei der TDP-43-Pathogenese .....	12
1.2.4 Bedeutung der TARDBP-Mutationen in der Pathogenese .....	15
1.2.5 Prion-ähnliche Verbreitung der TDP-43-Proteinopathien .....	17
1.3 Die Bäckerhefe <i>S. cerevisiae</i> als Modellorganismus.....	18
1.4 Zelluläre proteolytische Mechanismen .....	22
1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	23
1.4.2 Die Autophagie .....	25
1.4.2.1 Überblick und Definition .....	25
1.4.2.2 Arten der Autophagie.....	26
1.4.2.3 Molekulare Mechanismen der Autophagie .....	27
1.4.2.4 Physiologische Rolle der Autophagie .....	30
1.4.2.5 Pathophysiologische Rolle der Autophagie .....	31
1.4.2.6 Zusammenhang der Autophagie mit anderen proteolytischen Mechanismen .....	32
1.4.3 Der endosomal-vakuoläre Abbauweg.....	33
1.4.3.1 Überblick und Definition .....	33
1.4.3.2 Molekulare Mechanismen des endosomal-vakuolären Abbauwegs .....	35
1.4.3.3 Funktionen des endosomal-vakuolären Abbauwegs.....	38

1.4.4 Die Vakuolenfusion – das Bindeglied zwischen Autophagie und endosomalem Abbau.....	39
<b>2 Zielsetzung</b> .....	43
2.1 Identifikation zellulärer Einflussfaktoren auf die TDP-43-bedingte Zytotoxizität .....	43
2.2 Bestimmung des Einflusses von TDP-43 auf die vakuoläre Morphologie.....	44
2.3 Bestimmung des Einflusses von TDP-43 auf verschiedene Proteinkontrollmechanismen .....	44
2.4 Analyse von TDP-43 als potenzielles Substrat vakuolärer Abbauwege.....	45
2.5 Bestimmung des Einflusses von TDP-43 auf das Proteom von Hefezellen .....	46
<b>3 Material und Methoden</b> .....	48
3.1 Überblick über Hefestämme, Plasmide und Primer.....	48
3.2 Kultivierung und Lagerung von E. coli .....	60
3.3 Plasmidtransformation in E. coli .....	60
3.4 Plasmidpräparation aus E. coli.....	61
3.5 Kultivierung und Lagerung der Hefestämme .....	61
3.5.1 Allgemeines .....	61
3.5.2 Kultivierungsbedingungen zur Herstellung von Doppeldeletionsstämmen .....	62
3.5.3 Kultivierungsbedingungen für transformierte, dem Tüpfeltest bestimmte Stämme.....	63
3.5.4 Kultivierungsbedingungen für CMAC und Lucifer Yellow behandelte Zellen .....	63
3.5.5 Kultivierungsbedingungen gehungerter Zellen .....	64
3.5.6 Kultivierungsbedingungen für Rsp5-Mutationsstämmen und Ste3- bzw. Sna3-exprimierende Stämme .....	65
3.5.7 Kultivierungsbedingungen für SILAC-Kulturen .....	66
3.6 Herstellung von Doppeldeletionsstämmen .....	67
3.7 High-efficiency Transformation von Hefe .....	70
3.8 Bestimmung der Zytotoxizität in Hefe mittels Serial Spot Dilution Assays (Tüpfeltests).....	71
3.9 Auswertung des Tüpfeltestscreens.....	72
3.10 Färbung von Hefezellen und Fluoreszenzmikroskopie .....	73

3.11	Herstellung von Hefezelleextrakten .....	75
3.12	SDS-PAGE und Western Blot Analyse .....	76
3.13	Quantitative Proteomanalyse (SILAC-Analyse) .....	79
3.14	Statistik .....	81
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>82</b>
4.1	Identifizierung von Modulatoren der TDP-43-induzierten Zytotoxizität .....	82
4.1.1	Allgemeines zum TDP-43-Tüpfeltestscreen.....	82
4.1.2	Modifizierung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität in Peroxisomen- und Mitochondrien-assoziierten Deletionsstämmen und in Stämmen für die retrograde Stressantwort.....	88
4.1.3	Wachstumsanalyse von Stämmen mit einem deletierten multifunktionalen Gen in der Gegenwart von TDP-43 .....	89
4.1.4	TDP-43-bedingte Zytotoxizität in Stämmen mit einem deletierten Proteinqualitätskontrollgen .....	89
4.1.5	Veränderung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität bei verschiedenen Vakuolenfusionsmutanten .....	98
4.2	TDP-43 verändert die Vakuolenmorphologie und beeinflusst verschiedene vakuoläre Abbauege.....	101
4.2.1	TDP-43-Expression führt zur Fragmentierung der Vakuolen .....	101
4.2.2	Die TDP-43-Expression forciert den terminalen Abschnitt der Autophagie.....	110
4.2.3	Die TDP-43-Expression behindert die Endozytose und den MVB-Weg .....	114
4.3	Die Bedeutung zellulärer Abbauege beim Entfernen von TDP-43 .....	120
4.3.1	Eine gestörte Vakuolenfusion führt zu einer Anreicherung von TDP-43 .....	120
4.3.2	Die TDP-43-Eliminierung mittels Autophagie und UPS ist kontrovers.....	128
4.3.3	Ein gestörter MVB-Weg forciert die TDP-43-Akkumulation.....	132
4.3.4	Die Ubiquitinligase Rsp5 ist eine Schlüsselkomponente für den Abbau von TDP-43.....	136
4.4	Quantitative Veränderung der zellulären Proteinzusammensetzung bei TDP-43-Expression.....	140

<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b> .....	144
5.1	Auswirkungen der TDP-43-Expression auf die Vakuole und die proteolytischen Kontrollmechanismen .....	144
5.1.1	TDP-43 induziert die Autophagie .....	144
5.1.2	TDP-43 stört den endosomal-vakuolären Weg .....	147
5.1.3	TDP-43 führt zur Fragmentierung der Vakuole .....	149
5.2	Beteiligung proteolytischer Abbauwege an der Eliminierung von TDP-43 .....	150
5.2.1	TDP-43 ist kein primäres Substrat des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) .....	150
5.2.2	TDP-43 ist kein primäres Substrat der Autophagie .....	152
5.2.3	TDP-43 ist ein Substrat des endosomal-vakuolären Abbauwegs .....	156
5.2.4	Die Ubiquitinligase Rsp5 ist an der Eliminierung von TDP-43 beteiligt .....	162
5.2.5	Bedeutung der Vakuole und der Vakuolenfusion beim TDP-43-Abbauprozess .....	165
5.3	TDP-43 und die zellulären proteolytischen Mechanismen – ein pathologischer Teufelskreis .....	169
5.4	TDP-43-Expression führt zur Anreicherung von Hitzeschockproteinen .....	170
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	174
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	I
	Publikationsliste .....	XVII
	Posterpräsentationsliste .....	XVIII
	Danksagung .....	XIX
	Eidesstattliche Erklärung .....	XXI

# Abkürzungsverzeichnis

<i>ADH1</i>	Alkoholdehydrogenase 1-Gen
ALP	Alkalische Phosphatase
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Amp.	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
Atg	<i>autophagy-related</i> , Autophagie-bezogene Gene oder Proteine
ATP	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i> , Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
C9ORF72	Chromosom 9 <i>open reading frame</i> 72
<i>CamR</i>	Chloramphenicol-Resistenz
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CEN6	Centromersequenz von Hefe-Chromosom 6
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CMAC	7-Amino-4-chloromethylcoumarin
<i>CMD1</i>	Calmodulin-Gen, codiert Ca <sup>2+</sup> -bindendes Protein
CORVET	<i>class C core vacuole/endosome tethering</i>
CPY	Carboxypeptidase Y
Cvt	<i>cytoplasm-to-vacuole targeting</i> , Transport vom Zytoplasma zur Vakuole
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser / Reinstwasser
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DUB	Deubiquitinase

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> , endosomaler Sortierungskomplex für den Transport erforderlich
fALS	familiäre ALS
FTD	Frontotemporale Demenz
FTLD	Frontotemporallappen-Degeneration
FTLD-U	FTLD mit Ubiquitin-positiven Einschlüssen
FUS/TLS	<i>fused in sarcoma/translocated in liposarcoma</i> , im Sarkom fusioniert/ im Liposarkom transloziert, RNA-bindendes ALS-assoziiertes Protein
Gal.	Galaktose
<i>GAL1</i>	Promotor für die Expression der Galactokinase
<i>GAL10</i>	Promotor für die Expression der UDP-Glucose-4-Epimerase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> , Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Glu.	Glukose
<i>GPD</i>	Promotor für die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin, humanes Influenzavirus
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HOPS	<i>homotypic vacuole fusion and vacuolar sorting</i>
HRS	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein

ILV	intraluminales Vesikel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphatpuffer
LB	<i>lysogeny broth</i> , Vollmedium für <i>E. coli</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i> , Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Met	Methionin
<i>MET25</i>	Promotor für die Expression der <i>O</i> -acetyl homoserine- <i>O</i> -acetyl serine sulfhydrylase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MVB	<i>multivesicular bodies</i> , multivesikuläre Körper oder späte Endosomen
NAB	N-aryl Benzimidazol
Nedd4	<i>neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4</i> , Säugetierhomolog zu Rsp5 in Hefe
NP-40	<i>4-nonylphenyl-polyethylene glycol</i> , Detergenz
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	<i>phagophore assembly site</i> , prä-autophagosomale Struktur (Phagophore) oder Phagophor-Assemblierungsstelle
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion

PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PFN1	codierendes Gen für Profilin-1, ALS-assoziiertes Protein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI4,5P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Proteaseinhibitor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	<i>probability value</i> , Wahrscheinlichkeitswert
RBP	RNA-bindendes Protein
rcf	<i>relative centrifuge force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i> , RNA-Erkennungsmotiv
Rsp5	<i>reverses Spt-phenotype</i> , Hefehomolog zu humanem Nedd4
RT	Raumtemperatur
sALS	sporadische ALS
SCD	<i>synthetic complete medium with dextrose</i> , synthetisches Komplettmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCGal	<i>synthetic complete medium with galactose</i> , synthetisches Komplettmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle
SCRD	<i>synthetic complete medium with raffinose and glucose</i> , synthetisches Komplettmedium mit Raffinose und Glukose als Kohlenstoffquellen
SD-N	<i>synthetic minimal medium with dextrose lacking nitrogen</i> , synthetisches Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle und wenig Stickstoff, Hungermedium
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-

	Polyacrylamidgelelektrophorese
SG	<i>stress granule</i> , Stressgranula
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMD	<i>synthetic minimal medium with dextrose</i> , synthetisches Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle
SMGal	<i>synthetic minimal medium with galactose</i> , synthetisches Minimalmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle
SMRD	<i>synthetic minimal medium with raffinose and glucose</i> , synthetisches Minimalmedium mit Raffinose und Glukose als Kohlenstoffquellen
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SOC-Medium	<i>super optimal broth</i> , Wachstumsmedium für <i>E. coli</i>
SOD1	Superoxiddismutase 1
TAF15	TATA- <i>binding protein-associated factor 2N</i> , codierendes Gen für TAF15, ALS-assoziertes Protein
TARDBP	TAR DNA- <i>binding protein gene</i> , codierendes Gen für TDP-43, RNA-bindendes ALS-assoziertes Protein
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBK1	codierendes Gen für Serin/Threonin-Proteinkinase TBK1, ALS-assoziertes Protein
TBS-Puffer	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T-Puffer	<i>Tris-buffered saline with Tween</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TDP-43	TAR DNA- <i>binding protein 43</i> , TAR DNA-bindendes Protein 43, RNA-bindendes ALS-assoziertes Protein
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
T-Mix	Transformationsmix
TORC1	<i>target of rapamycin complex 1</i> , Serin-Threonin-Kinase, besteht aus den vier Komponenten TOR1 oder TOR2, Kog1, Lst8 und Tco89
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Trp	Tryptophan
u	<i>unit</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
Vam	<i>vacuolar morphogenesis</i> , vakuoläre Morphogenese
v.o.n.u.	von oben nach unten
Vps	<i>vacuolar protein sorting</i> , vakuoläre Proteinsortierung
wt	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> , Hefe-Stickstoff-Basis
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> , Hefeextrakt mit Pepton und Glukose, Vollmedium für Hefe
2 $\mu$	<i>multi-copy</i> -Plasmid

# Zusammenfassung

An der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), der häufigsten Form der Motoneuronerkrankung, erkranken jährlich bis zu 375.000 Personen weltweit. Der Verlust der Motoneurone führt zu muskulärer Atrophie und in der Regel innerhalb von fünf Jahren nach Ausbruch der Krankheit zum Tod. Fast alle ALS-Patienten zeigen eine zelluläre Fehllokalisation des nukleären Proteins TDP-43 ins Zytoplasma, wo es aggregiert vorliegt. TDP-43 ist ein ubiquitär vorkommendes RNA- und DNA-bindendes Protein mit vielfältigen Aufgaben. Die Expression von humanem TDP-43 im Modellorganismus Hefe rekapituliert relevante Krankheitsmerkmale aus höheren Organismen und Patienten, wie zytoplasmatische Aggregatbildung und Zytotoxizität. Ferner sind zahlreiche zelluläre Mechanismen, wie die Proteinqualitätskontrolle, zwischen Hefe und Mensch konserviert. Der Abbauweg von TDP-43 in der Zelle (sowohl im Neuron als auch in Hefe) ist noch nicht endgültig geklärt. Es gibt Hinweise, dass die proteolytischen Systeme, wie Autophagie, Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und der endosomal-vakuoläre Weg an der Eliminierung von TDP-43 beteiligt sind. Ausgehend von einem Tüpfeltestscreen mit 109 Deletionsmutanten sollte in der Arbeit die Rolle dieser Wege beim Abbau von zytotoxischem TDP-43 untersucht werden. Die Ergebnisse lassen auf ein neues Paradigma bei der TDP-43-Eliminierung schießen. So ist das UPS, zumindest in dieser Arbeit, nicht deutlich an der Beseitigung des Proteins beteiligt. Dahingegen ist der endosomal-vakuoläre Weg vorrangig für den Abbau von zytotoxischem TDP-43 verantwortlich, während die Autophagie als kompensatorisches System dient. Hierzu passen Beobachtungen, dass die vakuoläre Fusion und die Vakuole wichtig für den Abbau von TDP-43 sind. Interessanterweise unterstützt TDP-43 den terminalen Abschnitt der Autophagie, aber hemmt den endosomal-vakuolären Verlauf und somit den Weg, der für seinen eigenen Abbau relevant ist. TDP-43 kolokalisiert mit der E3-Ubiquitinligase Rsp5 (wichtig für den endosomal-vakuolären Weg). Die Ubiquitynylierung von TDP-43 durch Rsp5 könnte demnach zur Entfernung von TDP-43 beitragen. Eine Steigerung der Rsp5-Aktivität, des endosomal-vakuolären Wegs, der vakuolären Fusion sowie Funktion könnte die Degeneration von Neuronen verzögern. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der TDP-43-Überexpression auf die Proteinzusammensetzung in einer Hefezelle quantitativ beschrieben. 18 Proteine waren signifikant angereichert und 33 Proteine abgereichert. Hitzeschockproteine, wie Ssa4 und Hsp31, das Hefehomolog zum Parkinson-Erkrankungsrelevanten Protein DJ-1, reicherten sich an. Inwieweit diese Beobachtungen relevant für pathophysiologische Vorgänge sind, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

## Summary

Each year, up to 375,000 people develop amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most frequent motor neuron disease, worldwide. Loss of functional motor neurons normally results in muscular atrophy and death within five years after disease onset. Almost all ALS patients show cellular mislocalization of nuclear TDP-43 into the cytoplasm, where it forms aggregates. TDP-43 is a ubiquitously expressed RNA- and DNA-binding protein with diverse functions. Expression of human TDP-43 in the model organism yeast recapitulates disease-relevant features similar to those in higher models and patients, like cytoplasmic aggregation and cytotoxicity. In addition, numerous cellular mechanisms, like protein quality control, are conserved from yeast to human. The degradation pathway of TDP-43 in the cell (both in neurons and yeast) is still uncertain. There are evidences, that proteolytic systems, like autophagy, the ubiquitin-proteasome system (UPS) and the endosomal-vacuolar pathway, are involved in degradation of TDP-43. In this study, based on drop dilution assays with 109 deletion mutants, the importance of these pathways for cytotoxic TDP-43 degradation has been investigated. The results suggest a new paradigm for the elimination of TDP-43. At least in this work, UPS is apparently not involved in protein elimination. In contrast, the endosomal-vacuolar pathway is primarily responsible for TDP-43 reduction, while autophagy serves as a compensatory system. Consistent with these observations, vacuolar fusion and function are important for TDP-43 degradation. Interestingly, TDP-43 induces the terminal steps of autophagy, but inhibits the endosomal-vacuolar pathway, that is relevant for the own degradation. TDP-43 colocalizes with E3 ubiquitin ligase Rsp5 (important to the endosomal-vacuolar pathway). Therefore, the ubiquitination of TDP-43 by Rsp5 could contribute for removal of TDP-43. An improvement of Rsp5 activity, endosomal-vacuolar pathway and vacuolar fusion and function could delay the neuronal degradation.

Moreover, in this work, the impact of TDP-43 overexpression on the protein composition in yeast cells was quantitatively described. 18 proteins were significant upregulated and 33 proteins were downregulated. Heat shock proteins, like Ssa4 and Hsp31, the yeast homolog to the Parkinson's disease relevant protein DJ-1, were particularly enriched. To what extent these observations are relevant for pathophysiological processes must be investigated in further studies.

# 1 Einleitung

## 1.1 Klassifikation und Definition der Motoneuron-erkrankungen

Der demographische Wandel in den Industrieländern hin zu einer immer älter werdenden Bevölkerung rückt den wissenschaftlichen Fokus vermehrt auf die neurodegenerativen Erkrankungen, auf Grund des erhöhten Risikos im Alter. Aktuell leiden weltweit mehr als 40 Millionen Menschen an einer Degeneration des Nervensystems (Wood *et al.* 2015). Das stark heterogene, pathophysiologische Erscheinungsbild und die Komplexität der unter dieser Gruppe zusammengefassten Krankheiten erschwert deren strikte Abgrenzung und Ätiologie (Belzil *et al.* 2013, Wood *et al.* 2015). Als Auslöser werden genetische, umweltbedingte und endogene Faktoren (z. B. das Lebensalter) angesehen (Jellinger 2009, Tenreiro *et al.* 2013, Wood *et al.* 2015). Im Allgemeinen ist die Ursache bei Erkrankungsbeginn auf eine molekularbiologische Fehlregulation zurückzuführen. So werden die neurodegenerativen Erkrankungen durch eine abnormale Proteindynamik definiert (Jellinger 2009). Viele Proteine sind in ihrer nativen Umwelt sehr instabil, da sie sonst ihre biologische Funktion nicht ausführen können (Tenreiro *et al.* 2013). Ferner ist die Proteinbiosynthese fehleranfällig. Auf Grund dessen laufen Proteine ständig Gefahr, eine potenziell gefährliche Konformation anzunehmen. Neben der unsachgemäßen Faltung der Proteine, die als Hauptursache der neurodegenerativen Erkrankungen zählt, gehören der defekte Proteinabbau und die intra- und extrazelluläre Proteinaggregation zum Krankheitsbild (Forman *et al.* 2004, Jellinger 2009, Grad *et al.* 2015, Tenreiro *et al.* 2013). Die Überlastung der Qualitätskontrollmechanismen (Chaperone und Proteinabbauwege) führen zur Anreicherung fehlgefalteter Proteine, zur Bildung von Oligomeren, Fibrillen oder großen Aggregaten und zur Belastung der zellulären Homöostase (Forman *et al.* 2004, Belzil *et al.* 2013, Tenreiro *et al.* 2013). Diese sogenannte Proteinopathie ist ein Merkmal der meisten neurodegenerativen Erkrankungen. Allerdings ist dies nur ein Teil des Krankheitskomplexes. So tritt in den Zellen u. a. oxidativer Stress auf, welcher die Bildung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begünstigt. Neben einer gestörten Bioenergetik, einer mitochondrialen Dysfunktion und der Schädigung der DNA kommt es u. a. zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparats und zu einer Behinderung des zellulären und/oder axonalen Transports durch die Zerstörung der Neurofilamente. Des Weiteren werden Chaperone und Neurotrophine in ihrer physiologischen Funktion beeinträchtigt und neuroinflammatorische bzw. neuroimmune Prozesse, wie die Nekrose bzw. die Apoptose, aktiviert (Forman *et al.* 2004, Jellinger 2009, Morgan und Orrell

2016). All diese pathophysiologischen Mechanismen bedingen eine charakteristische progressive zelluläre Dysfunktion und den Verlust von Synapsen bzw. Neuronen in bestimmten Bereichen des Nervensystems (Belzil *et al.* 2013, Atkin und Paulson 2014, Wood *et al.* 2015).

Die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen zielt u. a. auf das Verständnis der molekularbiologischen Wirkungsweise der aggregierten Proteine bei der Krankheitspathogenese ab (Armakola *et al.* 2011). Eine erfolgreiche Ursachenforschung ermöglicht die Entwicklung wirkungsvoller Medikamente zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Nervensystems.

Die neurodegenerativen Krankheiten können in zwei klinische Gruppen unterteilt werden: motorische Erkrankungen und kognitive Persönlichkeitsstörungen (Belzil *et al.* 2013). Zu ersterem zählen beispielsweise die Parkinson-Krankheit, die Ataxie und die Motoneuronerkrankungen. Die genetische und biochemische Klassifikation gliedert die neurodegenerativen Krankheiten u. a. in  $\alpha$ -Synucleinopathien (z. B. Parkinson-Erkrankung), Tauopathien (z. B. Alzheimer-Krankheit), Prionerkrankungen (z. B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) oder Motoneuronerkrankungen (Abb. 1) (Jellinger 2009, Armakola *et al.* 2011).

Bei den Motoneuronerkrankungen handelt es sich um progressive Erkrankungen, bei der die oberen und/oder unteren motorischen Neuronen betroffen sind (Leigh und Ray-Chaudhuri 1994). Motoneuronen sind lange efferente Nervenzellen, die das Gehirn mit dem Rückenmark und den Skelettmuskeln verbinden (Julien 2001). Die oberen bzw. ersten Motoneuronen stammen vom oberen Motorcortex (Großhirnrinde) ab und reichen bis ins Rückenmark. Die unteren bzw. zweiten Motoneuronen verbinden das Rückenmark oder den Hirnstamm mit den Muskelfibrillen (Joyce *et al.* 2011, Jiang *et al.* 2015).

In Abhängigkeit der betroffenen Nervenzellen können verschiedene phänotypische Symptome beobachtet werden. So führt die Degeneration der ersten Motoneuronen zu gesteigerten Reflexen und erhöhtem Muskeltonus. Durch den Verlust der zweiten Motoneuronen entwickeln die Patienten oftmals Schluck- (Dysphagie) und Sprechstörungen (Dysarthrie), progressive Muskelschwäche und -schwund (Atrophie) sowie unwillkürliche Muskelbewegungen (Faszikulationen) (MSD Manual 7. Auflage). Die ersten Symptome treten zu 75% in den Extremitäten auf. Bei einem Viertel der Patienten zeigen sich zuerst Störungen beim Sprechen oder Schlucken, sogenannte bulbäre Symptome (Leigh und Ray-Chaudhuri 1994). 90-95% der Krankheitsfälle kommen sporadisch vor. Nur 5-10% haben einen familiären Hintergrund (Leigh und Ray-Chaudhuri 1994). Motoneuronerkrankungen



**Abb. 1: Genetische und biochemische Klassifizierung neurodegenerativer Erkrankungen nach Jellinger 2009 und Winter und Ludolph 2004.** Die von Jellinger postulierte Unterteilung neurodegenerativer Erkrankungen erfolgt in 12 Hauptgruppen. Diese wiederum werden in mehrere Untergruppen gegliedert. Die Zuordnung der Motoneuronerkrankungen erfolgte nach den Vorschlägen von Winter und Ludolph. Hiernach gehören die Untergruppen Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), spinale Muskelatrophie (SMA) und spastische Spinalparalyse zu den Motoneuronerkrankungen. Die neurodegenerativen Erkrankungen werden in der Übersicht beispielhaft aufgeführt. Die Existenz von weiteren Haupt- und Nebengruppen ist mit Auslassungspunkten gekennzeichnet.

haben eine Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) von 1-2 Personen pro 100.000, die Prävalenz (Anzahl der Erkrankten) liegt bei 4-6 Personen pro 100.000 (Leigh und Ray-Chaudhuri 1994). Diese Formen neurodegenerativer Erkrankungen sind bis heute unheilbar. Die Lebenserwartung kann durch medikamentöse Behandlung (Riluzol, ein Glutamatantagonist) und operative bzw. physiotherapeutische Methoden um einige Monate verlängert werden (Leigh und Ray-Chaudhuri 1994, Winter und Ludolph 2004). Der Tod tritt jedoch meist innerhalb von fünf Jahren nach Krankheitsbeginn ein (Leigh und Ray-Chaudhuri 1994).

Die Motoneuronerkrankungen umfassen drei Untergruppen: die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die spinale Muskelatrophie (SMA) und die spastische Spinalparalyse (Winter und Ludolph 2004). Charakteristisch für die Spinale Muskelatrophie ist die Beschränkung der Neurodegeneration auf die unteren Motoneuronen im Rückenmark und im Hirnstamm (Winter und Ludolph 2004). Die Inzidenz für SMA liegt bei 1:10.000 und umfasst eine stark heterogene Gruppe von Erkrankungen. Der überwiegende Teil der SMA Typen wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Symptome umfassen u. a. Lähmungen, niedrigen Butdruck (Hypotonie) und verminderte Auslösbarkeit eines Reflexes (Hyporeflexie) (Winter und Ludolph 2004, MSD Manual 7. Auflage).

Die spastischen Spinalparalysen (Lähmungen), eine Gruppe aus vorwiegend autosomal-dominant vererbten Erkrankungen, werden durch den Verlust der oberen Motoneuronen im Motorcortex und in den Pyramidenbahnen verursacht (Winter und Ludolph 2004). Das kennzeichnende Symptom ist die Lähmung der Beine. Ferner können Gangstörungen, Krämpfe (Spastik) und gesteigerte Muskelreflexe auftreten (Winter und Ludolph 2004).

Die am häufigsten vorkommende Motoneuronerkrankung ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Jiang *et al.* 2015, Lee und Kim 2015). In den USA wird sie auch als Lou Gehrig Erkrankung bezeichnet (Couthouis *et al.* 2011, Ling *et al.* 2013, Taylor *et al.* 2016). Bereits im 19. Jahrhundert beschrieben verschiedene Mediziner und Neurologen Symptome, die charakteristisch für die damals noch unbekannte ALS waren (Bell 1830, Aran 1850, Cruveilhier 1853). Besonders der Franzose Jean-Martin Charcot machte sich durch seine wissenschaftliche Tätigkeit im Bereich der ALS-Phänotypisierung verdient (Charcot und Joffroy 1869, Charcot 1874, Charcot und Marie 1885).

Die ALS zeichnet sich durch die an einem Krankheitsherd beginnende, sich in andere Regionen ausbreitende nervale Dysfunktion der Motoneuronen aus (Forman *et al.* 2004, Belzil *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Fukunaga *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015, Jiang *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Wood *et al.* 2015, Guerrero *et al.* 2016, Morgan und Orrell 2016, Taylor *et al.* 2016). Infolgedessen werden die Muskelfibrillen unzureichend „ernährt“ und schwinden/atrophieren (Winter und Ludolph 2004, Ling *et al.* 2013, Taylor *et al.* 2016). Dieser Vorgang wird auch als Amyotrophie bezeichnet. Bei einer Lateralsklerose kommt es zu einer ertastbaren Vernarbung bzw. Verhärtung des lateralen Teils der Wirbelsäule infolge des vorzeitigen Verfalls der Nervenzellen (Rowland und Shneider 2001, Winter und Ludolph 2004, Ling *et al.* 2013, Taylor *et al.* 2016). Weitere histopathologische Kriterien der ALS sind das Auftreten einer Gliose (krankhafte Anreicherung von Gliazellen infolge des neuronalen Verlusts in betroffenen Gehirnbereichen) und die Bildung

intrazellulärer Ubiquitin-positiver Einschlüsse bei einem Teil der verbliebenen Neuronen (Forman *et al.* 2004, Winter und Ludolph 2004, Wood *et al.* 2015). Die erhöhte Anzahl an reaktiven Astrozyten und Zytokinen sowie der Zusammenbruch der Blut-Gehirn-Schranke sind inflammatorische Symptome der ALS (Wood *et al.* 2015). Die phänotypischen Merkmale umfassen auf Grund der Degeneration der oberen und unteren Nervenzellen das gesamte Spektrum der Motoneuronerkrankungen. So manifestieren sich bei ca. zwei Drittel der Patienten eine progressive muskuläre Schwäche, Steifheit, Lähmung (Paralyse), Krämpfe (Spastik), Muskelschwund, unwillkürliche Muskelbewegungen (Faszikulation) sowie erhöhte Reflexe und Tonus primär in den Gliedmaßen. Bei den restlichen Krankheitsfällen erscheinen zunächst Sprech- und Schluckschwierigkeiten (Forman *et al.* 2004, Kiernan *et al.* 2011, Belzil *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Fukunaga *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015, Jiang *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Guerrero *et al.* 2016, Taylor *et al.* 2016). Im weiteren Verlauf der Erkrankung führen diese Beschwerden zum Verlust der Gehfähigkeit, der Arm- und Handfunktion sowie zu Gewichtsverlust und Mangelernährung (Kiernan *et al.* 2011, Morgan und Orrell 2016). Ferner leiden die Erkrankten unter respiratorischer Insuffizienz, welches die Hypoventilation (geringe Lungenbelüftung) und die Hyperkapnie (CO<sub>2</sub> Anreicherung) forciert (Kiernan *et al.* 2011). Bei ungefähr 50% der Patienten zeigen sich zusätzlich kognitive Störungen und bei mehr als 20% entwickelt sich eine Frontotemporallappen-Degeneration (FTLD) (Forman *et al.* 2004, Guerrero *et al.* 2016). ALS zeichnet sich durch eine hohe Letalität aus. Die meisten Patienten versterben innerhalb von drei bis fünf Jahren nach Krankheitsbeginn durch Lungenversagen (Julien 2001, Belzil *et al.* 2013, Fukunaga *et al.* 2015, Morgan und Orrell 2016, Lee und Kim 2015, Taylor *et al.* 2016). Allerdings haben manche Formen eine höhere Lebenserwartung. So überleben 20% mehr als fünf Jahre und noch einmal 5-10% mehr als 10 Jahre (Winter und Ludolph 2004, Kiernan *et al.* 2011, Grad *et al.* 2015, Lee und Kim 2015). Bis heute gibt es keinen eindeutigen diagnostischen Test oder Biomarker für ALS, nur die eben beschriebenen klinischen Merkmale stützen die Diagnose (Couthouis *et al.* 2011).

ALS ist eine idiopathische Erkrankung, d.h. sie entsteht nahezu immer ohne erfassbare Ursache (Kiernan *et al.* 2011). Jedoch werden verschiedenste Mechanismen auf molekularer, zellulärer und systematischer Ebene vorgeschlagen (Kiernan *et al.* 2011, Prpar Mihevc *et al.* 2017). In zahlreichen Experimenten konnten eine Beteiligung bestimmter Faktoren an der ALS-Pathologie nachgewiesen werden. So sind die Proteinfehlfaltung und -aggregation die wohl am häufigsten diskutierten und untersuchten Ursachen für ALS (Joyce *et al.* 2011, Polymenidou und Cleveland 2011, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Ferner ist der gestörte

Proteinabbau eine zentrale Komponente der ALS-Forschung (Joyce *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2016). Die eben beschriebenen Faktoren zählen zu den endogenen Ursachen. Des Weiteren gehören die veränderte mRNA-Prozessierung, die Dysfunktion der RNA-Stressantwort, die mitochondriale Fehlfunktion, ER-Stress, Defekte im Axonentransport, Exzitotoxizität (Tod der Nervenzelle durch Reizüberflutung mit dem Neurotransmitter Glutamat) und nichtzellautonome Toxizität in diese Gruppe (Boillée *et al.* 2006, Joyce *et al.* 2011, Kiernan *et al.* 2011, Fukunaga *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015, Jiang *et al.* 2015, Wood *et al.* 2015, Morgan und Orrell 2016, Guerrero *et al.* 2016, Taylor *et al.* 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Letzteres diskutiert die Beteiligung von nichtneuronalen Zellen, wie Gliazellen und Astrozyten, am Krankheitsverlauf. Beide können das Überleben der Motoneuronen durch ungenügende Freigabe neurotrophischer Faktoren, durch Abgabe neurotoxischer Mediatoren oder durch die Regulierung der Glutamatrezeptorexpression beeinflussen und somit die ALS-Pathologie beschleunigen (Joyce *et al.* 2011, Kiernan *et al.* 2011, Grad *et al.* 2015, Taylor *et al.* 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Neben diesen endogenen Faktoren könnten verschiedene Umweltfaktoren ALS begünstigen. So werden elektromagnetische Strahlung, Neurotoxine, Schwermetalle, Pestizide, Infektionen in der Kindheit, Zigarettenrauch, berufsbedingte Belastung oder Hochleistungssport mit Erschütterung des Kopfes als mögliche Ursachen diskutiert (Guerrero *et al.* 2016, Kiernan *et al.* 2011).

Das Durchschnittsalter beim Beginn von ALS beträgt 50 bis 55 Jahre (Lee und Kim 2015, Taylor *et al.* 2016). Das Krankheitsrisiko steigt ab 60 Jahren und erreicht seinen Höhepunkt bei 75 Jahren (Forman *et al.* 2004, Morgan und Orrell 2016).

Die Amyotrophe Lateralsklerose kann familiär gehäuft (fALS) oder sporadisch auftreten (sALS). Eine klinische Unterscheidung beider Formen ist nicht möglich (Andersen und Al-Chalabi 2011, Hübers *et al.* 2013). Bei der zu 90-95% vorkommenden sALS ist die Ätiologie größtenteils unbekannt (Ling *et al.* 2013, Fukunaga *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015). Allerdings werden umweltbedingte und genetisch Faktoren vermutet (Fukunaga *et al.* 2015). Verwandte von sALS-Patienten haben ein erhöhtes Risiko, selbst an ALS oder an einem anderen neurodegenerativen Leiden zu erkranken (Andersen und Al-Chalabi 2011). Die fALS zeigt sich bei 5-10% der Krankheitsfälle und ist durch einen autosomal-dominanten Vererbungsgang mit hoher Penetranz (Wahrscheinlichkeit, dass der Genotyp zum Phänotyp wird) gekennzeichnet (Joyce *et al.* 2011, Hübers *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Fukunaga *et al.* 2015, Wood *et al.* 2015, Morgan und Orrell 2016, Taylor *et al.* 2016). Bei ca. 70% der fALS liegt eine genetische Ursache in Form einer Genmutation zugrunde (Fukunaga *et al.* 2015).

Jedoch treten mutierte Gene nicht nur bei fALS sondern auch sALS auf (Andersen und Al-Chalabi 2011).

Eine Einordnung der ALS-assoziierten Proteine kann in drei Gruppen erfolgen: Proteostase und Proteinqualitätskontrolle, mRNA-Stabilität, Funktion und Metabolismus sowie Zytoskelett-Dynamik (Taylor *et al.* 2016). Bis heute sind mehr als 50 potenzielle ALS-Gene veröffentlicht, wobei lediglich 16 Genmutationen eindeutig an der ALS-Pathogenese beteiligt sind (Taylor *et al.* 2016). Dazu gehören beispielsweise SOD1, TARDBP, FUS/TLS, C9ORF72, PFN1, TAF15 oder TBK1 (Couthouis *et al.* 2011, Cirulli *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Guerrero *et al.* 2016). Die erste Mutation wurde 1993 im SOD1-Gen beschrieben (Grad *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Guerrero *et al.* 2016). Das ubiquitär, überwiegend im Zytosol vorkommende SOD1 wird zur Reduktion von Sauerstoffradikalen benötigt und schützt durch deren Funktion die Zelle vor oxidativem Stress (Andersen und Al-Chalabi 2011, Hübers *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Taylor *et al.* 2016). Ungefähr 20% aller fALS-Patienten zeigen eine SOD1-Mutation (Ajroud-Driss und Siddique 2015, Grad *et al.* 2015). 2-3% der sALS-Fälle sind auf eine Veränderung im SOD1-Gen zurückzuführen (Ajroud-Driss und Siddique 2015). Aktuell sind mehr als 170 ALS-assoziierte Mutationen bekannt, welche in fast allen Bereichen des Gens lokalisiert sind (Taylor *et al.* 2016). Mutierte SOD1 ist in der Lage mit nichtspezifischen Substraten zu interagieren (Hinzugewinn einer zytotoxischen Funktion, *gain-of-function*), wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet sowie Zellproteine, Lipide und Nukleinsäuren geschädigt werden (Hübers *et al.* 2013, Grad *et al.* 2015). Dies führt u. a. zu ER-Stress, mitochondriale Fehlfunktion und zur Zerstörung des Zytoskeletts (Julien 2001, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Grad *et al.* 2015).

Das Gen für das RNA-bindende Protein FUS/TLS ist auf Chromosom 16 lokalisiert und ähnelt in Aufbau und Funktion TDP-43 (Andersen und Al-Chalabi 2011). So ist das Protein u. a. für das alternative Spleißen, für die Transkription, für die Prozessierung von mRNA sowie für deren Transport und Translation zuständig (Andersen und Al-Chalabi 2011, Ratti und Bugatti 2016). Patienten mit einer fALS tragen zu ca. 5% eine Mutation in FUS/TLS. Die meisten der insgesamt 42 beschriebenen Mutationen befinden sich im Exon 14 und 15 (Andersen und Al-Chalabi 2011). Diese Regionen codieren für den C-Terminus des neurotoxischen Proteins. Die Mutationen bedingen die Fehllokalisierung des Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma (Grad *et al.* 2015, Ratti und Bugatti 2016).

Die meisten ALS-Fälle (90-97%) sind gekennzeichnet durch eine zytoplasmatische Aggregation und eine nukleäre Abreicherung (Depletion) von wildtypischem TDP-43. Diese

pathologischen Merkmale treten unabhängig von einer Genmutation und der ALS-Erscheinungsform auf (Braun *et al.* 2011, Joyce *et al.* 2011, Lee *et al.* 2011A, Bozzo *et al.* 2016, Taylor *et al.* 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Aus diesem Grund gehört die ALS nicht nur zu den Motoneuronerkrankungen, sondern auch zu den sogenannten TDP-43-Proteinopathien (Abb. 1).

## 1.2 Das TAR DNA-bindende Protein TDP-43

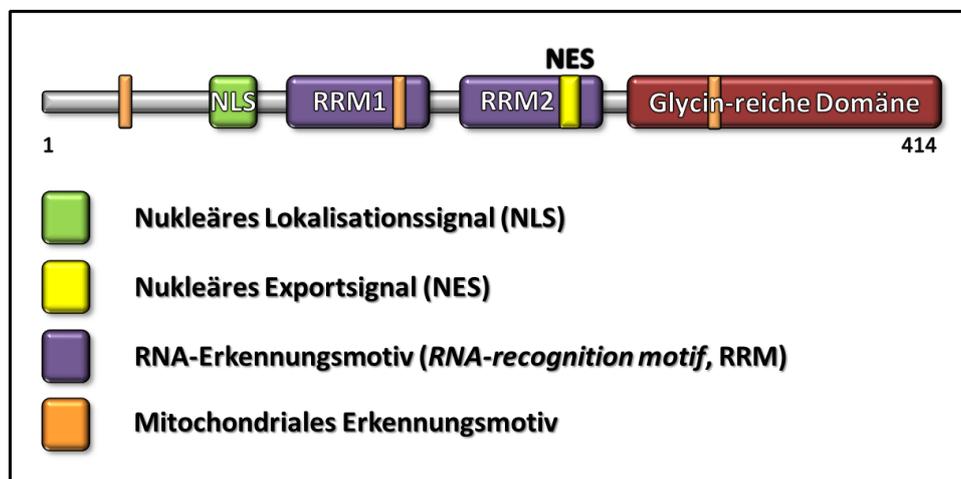
### 1.2.1 Physiologisches Vorkommen von TDP-43

Eine richtungsweisende Veränderung in Bezug auf das Verständnis der ALS-Pathologie war die Entdeckung von TDP-43 als eine Hauptkomponente von ubiquitinierten Proteinaggregaten in vielen Patienten mit ALS und FTLD-U (FTLD mit Ubiquitin-positiven Einschlüssen) (Arai *et al.* 2006, Neumann *et al.* 2006, Lagier-Tourenne und Cleveland 2009). Das im humanen Genom auf Chromosom 1p36.22 lokalisierte TDP-43 Gen TARDBP ist ein evolutionär stark konserviertes Gen. Das Protein wird sowohl in Säugetieren als auch in Wirbellosen (z. B. in Mensch, Maus, Fruchtfliege und Fadenwurm) exprimiert (Warraich *et al.* 2010, Bose *et al.* 2011, Buratti 2015, Fontana *et al.* 2015, Guerrero *et al.* 2016). Das primäre TARDBP Transkript besteht aus sechs Exons und kann durch alternatives Spleißen in 11 unterschiedliche mRNAs transformiert werden, darunter die mRNA für TDP-43 (Pesiridis *et al.* 2009, Warraich *et al.* 2010, Fontana *et al.* 2015). Im Menschen ist TDP-43 ein ubiquitär synthetisiertes Protein, dessen Expressionslevel in Abhängigkeit des Gewebes variiert (Warraich *et al.* 2010, Grad *et al.* 2015, Bozzo *et al.* 2016). Das als einzelnes Molekül oder als Homodimer aktive Protein ist überwiegend im Zellkern lokalisiert (Chen-Plotkin *et al.* 2010, Lee *et al.* 2011A, Tollervey *et al.* 2011, Fontana *et al.* 2015, Bozzo *et al.* 2016, Guerrero *et al.* 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Jedoch ist TDP-43 in der Lage, zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu pendeln und kann daher bis zu einem gewissen Grad auch zytoplasmatisch nachgewiesen werden (Lee *et al.* 2011A, Ling *et al.* 2013, Fontana *et al.* 2015, Buratti 2015, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Der Proteinanteil im Zytoplasma kann signifikant durch die Induktion von Stress (z. B. oxidativ, osmotisch, thermal, mitochondrial) gesteigert werden. Hierbei wird TDP-43 aktiv in die zytoplasmatischen Stressgranula (SGs) rekrutiert, um die Translation von wichtigen *housekeeping* Genen zu unterbinden, Reparaturprozesse einzuleiten, mRNA-Schäden zu minimieren und insgesamt die Zelle vor Schädigung zu schützen (Lee *et al.* 2011A, Li *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015,

Aulas und Vande Velde 2015, Fontana *et al.* 2015, Bozzo *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016).

### 1.2.2 Aufbau und Funktion von TDP-43

Das aus 414 Aminosäuren bestehende TDP-43-Protein gehört zur Familie der heterogenen, nukleären Ribonucleoproteine (hnRNP) (Warraich *et al.* 2010, Belzil *et al.* 2013, Buratti 2015, Grad *et al.* 2015, Bozzo *et al.* 2016, Guerrero *et al.* 2016). Es weist klassische Elemente der hnRNPs auf, wie zwei RNA-Erkennungsmotive (*RNA Recognition Motifs*, RRM)s sowie die N- und C-terminale Region, welche zur Interaktion mit anderen Proteinen dienen (Abb. 2) (Lee *et al.* 2011A, Ratti und Bugatti 2016).



**Abb. 2: Struktureller Aufbau von TDP-43.** Das Protein besteht aus insgesamt 414 Aminosäuren und enthält einen Glycin-reichen C-Terminus, zwei RNA-Erkennungsmotive, jeweils ein nukleäres Lokalisierungssignal bzw. ein nukleäres Exportsignal und drei mitochondriale Erkennungsmotive.

Die Glycin-reiche C-terminale Region erstreckt sich von der 277. bis zur 414. Aminosäure und ist reich an Glutamin, Asparagin und Glycin (Li *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Grad *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Iguchi *et al.* 2016). Der C-Terminus ist multifunktional und für die normale Proteinfunktion essentiell (Lagier-Tourenne *et al.* 2010, Warraich *et al.* 2010, Udan-Johns *et al.* 2013, Grad *et al.* 2015). So vermittelt die Domäne Protein-Protein-Interaktionen u. a. mit Chaperonen, ermöglicht das schnelle Verschmelzen in SGs und unterstützt das Protein beim korrekten Spleißen von TDP-43-Substraten (Li *et al.* 2013, Udan-Johns *et al.* 2013, Buratti 2015, Grad *et al.* 2015). Auf Grund seiner geringen Sequenzkomplexität ist die Region anfällig gegenüber Fehlfaltung und Selbstaggregation (Johnson *et al.* 2009, Ling *et al.* 2013, Grad *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Iguchi *et al.* 2016). Allerdings ist die C-terminale Domäne nicht allein für die Proteinaggregation verantwortlich. Darüber hinaus wird

mindestens ein intaktes RRM benötigt, um Aggregate im Zytoplasma zu induzieren (Johnson *et al.* 2008, Cascarina und Ross 2014, Lee und Kim 2015).

Der N-Terminus von TDP-43 ist genauso wie die C-terminale Sequenz an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt (Grad *et al.* 2015, Buratti 2015, Ratti und Bugatti 2016). Überdies reguliert es die Faltung des Monomers, welches für eine schnelle Dimerisierung des Proteins und für das Spleißen essentiell ist (Bozzo *et al.* 2016). Ferner ist die N-terminale Region pathologisch relevant. Sie potenziert die Unlöslichkeit von TDP-43, ermöglicht eine erhöhte Interaktion mit anderen Aggregaten und spielt ebenso wie der C-Terminus eine fundamentale Rolle bei der Aggregationsneigung des Proteins (Budini *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015, Buratti 2015).

Die RNA-Erkennungsmotive (RRM1, RRM2) sind evolutionär stark konserviert und bevorzugen (UG)<sub>n</sub>-reiche Sequenzen (Lagier-Tourenne *et al.* 2010, Tollervey *et al.* 2011, Buratti 2015, Fontana *et al.* 2015, Guerrero *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016). Beide Regionen sind essentiell für eine normale TDP-43-Funktion (Guerrero *et al.* 2016). RRM1 ist wesentlich für die Bindung von TDP-43 an einzelsträngige RNA und wird vermutlich für die Interaktion mit Einzel- und Doppelstrang-DNA benötigt (Lagier-Tourenne *et al.* 2010, Guerrero *et al.* 2016). Die Rolle von RRM2 ist noch unklar. Es ist möglicherweise an der Organisation von Chromatin, an der DNA-Interaktion oder an der TDP-43-Dimerisierung beteiligt (Lagier-Tourenne *et al.* 2010).

Das nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) ist im N-Terminus und das nukleäre Exportsignal (NES) im RRM2 lokalisiert (Buratti 2015). NLS und NES ermöglichen das Pendeln von TDP-43 zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma (Warraich *et al.* 2010).

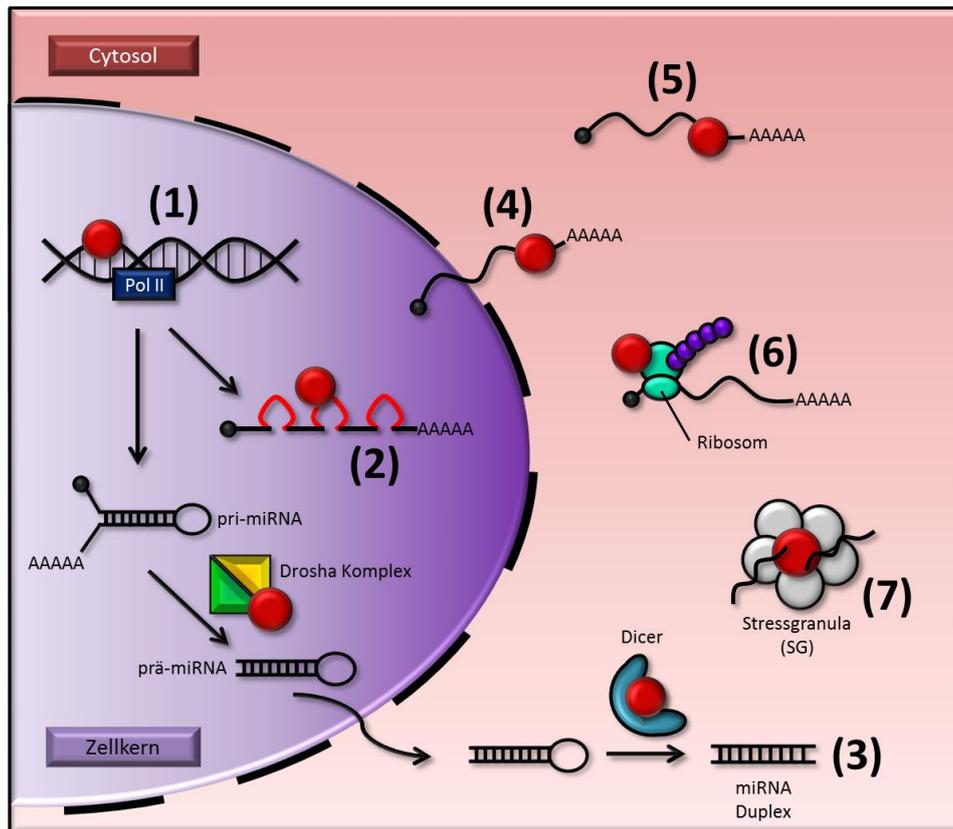
Jedoch wurde TDP-43 nicht nur in diesen beiden Kompartimenten lokalisiert, sondern auch in den Mitochondrien (Wang *et al.* 2016). Die mitochondriale Lokalisation ist hierbei abhängig von drei internen Erkennungsmotiven (M1, M3, M5) (Abb. 2) (Wang *et al.* 2016). Ist eines dieser Motive deletiert, so sind der Import und die Lokalisation von Flag-markiertem, rekombinantem TDP-43 in den Mitochondrien signifikant reduziert (Wang *et al.* 2016).

Auf Grund seiner vielfältigen zellulären Aufgaben zählt TARDBP zu den essentiellen Genen. Die Störung der TARDBP-Genexpression bzw. die Deletion des Gens führt zu Defekten in der frühen embryonalen Entwicklung, zur Beeinträchtigung der motorischen Funktion bzw. zu einer pränatalen Lethalität (Sephton *et al.* 2010, Bose *et al.* 2011, Joyce *et al.* 2011, Lee *et al.* 2011A, Belzil *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Fontana *et al.* 2015, Grad *et al.* 2015, Guerrero *et al.* 2016). Während des embryonalen Wachstums in Mäusen, Ratten und Zebrafischen konnte eine starke Expression von TDP-43 nachgewiesen werden. Diese nahm kontinuierlich in der

postnatalen Phase ab. Bei TDP-43 handelt es sich daher um ein entwicklungsregulierendes Protein, welches wesentlich zur pränatalen Entwicklung und/oder zur neuronalen Funktion beiträgt (Sephton *et al.* 2010, Warraich *et al.* 2010, Bose *et al.* 2011).

Das multifunktionale Protein TDP-43 wurde erstmals 1995 im Zusammenhang mit dem humanen Immunschwäche-Virus HIV-1 beschrieben (Ou *et al.* 1995, Kiernan *et al.* 2011, Buratti 2015). Hierin konnte TDP-43 als ein 43 kDa schweres Protein charakterisiert werden, welches eine spezifische Bindung an die sogenannte TAR (*Trans-Activation Response*) DNA aufweist. TAR ist eines von mehreren regulatorischen Elementen des HIV-1 Gens und ist besonders Pyrimidin-reich. TDP-43 bindet als Transkriptionsfaktor diese Sequenz und reprimiert dadurch die Genexpression. Neben HIV-1 werden SP-10 (benötigt für die Spermagenese) in der Maus und CDK6 (Cyclin-abhängige Kinase 6, wichtig für die Zellzyklusprogression) durch TDP-43 reguliert (Guerrero *et al.* 2016).

Abgesehen von der Funktion als transkriptioneller Regulator ist TDP-43 am Spleißen der prä-mRNA, an der Expression von lncRNAs (lange nichtcodierende RNAs) und ncRNAs (nichtcodierende RNAs) bzw. an der miRNA (microRNA) Biogenese beteiligt. Im Zytoplasma stabilisiert es die mRNA, transportiert diese zu ihrem Bestimmungsort und reguliert deren Translation (Abb. 3) (Warraich *et al.* 2010, Bose *et al.* 2011, Da Cruz und Cleveland 2011, Lee *et al.* 2011A, Polymenidou *et al.* 2011, Tollervey *et al.* 2011, Sephton *et al.* 2011, Belzil *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Fontana *et al.* 2015, Fukunaga *et al.* 2015, Xia *et al.* 2015, Bozzo *et al.* 2016, Guerrero *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016, Taylor *et al.* 2016, Ederle und Dormann 2017, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Ferner wird TDP-43 zum Recycling von Plasmaproteinen und für die zelluläre Stressantwort benötigt (Schwenk *et al.* 2016). Hierbei ist TDP-43 nicht nur ein Bestandteil der SGs, sondern fördert durch die Bindung an 14-3-3 Proteinen die Expression von Genen für die Stressantwort (Lagier-Tourenne *et al.* 2010, Ling *et al.* 2013, Fukunaga *et al.* 2015, Guerrero *et al.* 2016).

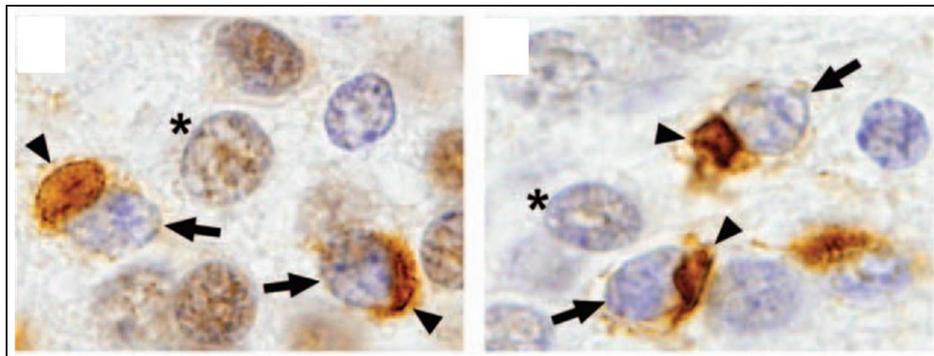


**Abb. 3: Schematischer Überblick der zellulären Funktionen von TDP-43.** TDP-43 ist ein multifunktionales Protein, welches zahlreiche Aufgaben sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma übernimmt. (1) Intranukleär kontrolliert TDP-43 die Transkription, indem es z. B. TAR DNA bindet und dadurch die RNA Synthese reprimiert. (2) Ferner kolokalisiert TDP-43 mit neusynthetisierter prä-mRNA und reguliert deren Spleißen. (3) Die Prozessierung von miRNA ist eine weitere Funktion des Proteins. Hierbei interagiert TDP-43 mit dem Drosha Komplex (Microprocessor complex) und der Endoribonuklease Dicer. (4) TDP-43 übernimmt eine aktive Rolle beim Transport von mRNA und kolokalisiert mit verschiedenen anderen Transportproteinen. (5) Das Protein gilt als Regulator der mRNA-Stabilität. (6) Die Translation von mRNA in den Neuriten ist stark mit deren Transport assoziiert. TDP-43 ist an der lokalen Translation in den Synapsen beteiligt und dient hierbei als Repressor. (7) Bei einer Stressinduktion bilden sich sogenannte Stressgranula (SG), die u. a. TDP-43 enthalten.

### 1.2.3 Bedeutung der posttranslationalen Modifikation bei der TDP-43-Pathogenese

2006 wurde TDP-43 als ein krankheitsrelevantes Protein identifiziert. Übereinstimmend beschrieben zwei Arbeitsgruppen wildtypisches TDP-43 als das Haupterkrankungsprotein in Tau- und  $\alpha$ -Synuclein-negativen sowie Ubiquitin- und p62-positiven Einschlüssen bei ALS- und FTD-Patienten (Arai *et al.* 2006, Neumann *et al.* 2006). Die ausschließlich im Zentralnervensystem (Neuronen und Gliazellen) gefundenen Aggregate wurden jedoch auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen entdeckt. Infolgedessen prägten Arai *et al.* (2006) den Begriff der TDP-43-Proteinopathie. Zu dieser Untergruppe der neurodegenerativen Erkrankungen gehören neben ALS und FTL, die FTD, Alzheimer-

Krankheit, Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington, kortikobasale Degeneration, Demenz mit Lewy-Körperchen, das Down Syndrom und verschiedene Myopathien (Abb. 1) (Arai *et al.* 2006, Johnson *et al.* 2009, Pesiridis *et al.* 2009, Lagier-Tourenne *et al.* 2010, Ling *et al.* 2010, Da Cruz und Cleveland 2011, Lee *et al.* 2011A, Ling *et al.* 2013, Aulas und Vande Velde 2015, Guerrero *et al.* 2016, Schwenk *et al.* 2016, Taylor *et al.* 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). FTLD und FTD sind zwei artverwandte Begriffe, die abhängig von der Quelle leicht unterschiedlich definiert werden (Arai *et al.* 2006, Kryndushkin und Shewmaker 2011). Charakteristisch für alle TDP-43-Proteinopathien sind die nukleäre Depletion des Proteins, die zytoplasmatische Fehllokalisierung, die abnormale Hyperphosphorylierung, Ubiquitinierung und Fragmentierung von TDP-43 in ca. 25 kDa große C-terminale Fragmente (enthalten keine NLS-Sequenz) (Abb. 4) (Arai *et al.* 2006, Neumann *et al.* 2006, Johnson *et*



**Abb. 4: Pathophysiologisches Erscheinungsbild der TDP-43-Proteinopathie im Hippocampus von FTLD-U Patienten.** Die Nervenzellen wurden mit einem TDP-43-spezifischen Antikörper behandelt und zeigen die charakteristische TDP-43-Pathologie mit einer nukleären Depletion (markiert mit einem Pfeil) und einer zytoplasmatischen Akkumulation des TDP-43-Proteins (gekennzeichnet mit einer Pfeilspitze). Histologisch unauffällige Zellen wurden mit einem Stern markiert. Übernommen von Igaz *et al.* 2008.

*al.* 2009, Lagier-Tourenne und Cleveland 2009, Pesiridis *et al.* 2009, Urushitani *et al.* 2010, Da Cruz und Cleveland 2011). Neben der typischen pathologischen Umverteilung von TDP-43 vom Zellkern ins Zytoplasma können vereinzelt auch intranukleäre Aggregate auftreten. Diese sind ebenso posttranslational modifiziert wie die TDP-43-positiven zytoplasmatischen Einschlüsse (Lee *et al.* 2011A, Li *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Guerrero *et al.* 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Wie diese Veränderungen zur Bildung der pathologischen TDP-43-Aggregate beitragen, muss noch endgültig geklärt werden (Lee *et al.* 2011A, Li *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Ratti und Bugatti 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Allerdings ist es denkbar, dass sie toxische Eigenschaften, Aggregation und Proteinfehlfunktionen bei TDP-43 induzieren (Belzil *et al.* 2013). Im gesunden Gehirn ist TDP-43 kaum phosphoryliert oder ubiquitiniert, nur im Zentralnervensystem von ALS- und

FTLD-Patienten ist TDP-43 abweichend verändert und gespalten (Lee *et al.* 2011A, Li *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Bozzo *et al.* 2016, Guerrero *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017).

Zu den abnormalen Modifikationen gehört die Phosphorylierung der in TDP-43 vorkommenden Serinreste (Lee *et al.* 2011A, Guerrero *et al.* 2016). Dies hat widersprüchliche Auswirkungen zur Folge. Einerseits erhöht die Phosphorylierung die Unlöslichkeit, die Halbwertszeit und die Resistenz des Proteins gegenüber dem proteasomalen Abbau (Lee *et al.* 2011A, Belzil *et al.* 2013, Fontana *et al.* 2015). Ferner steigern nachweislich mutierte Serinreste die TDP-43-bedingte Zytotoxizität in *C. elegans* (Guerrero *et al.* 2016). Auf der anderen Seite beeinflusst die Phosphorylierung im Zellkultursystem weder die TDP-43-Aggregation noch die Toxizität (Guerrero *et al.* 2016). Einige Autoren vermuten sogar, dass die Phosphorylierung die Aggregatbildung verhindert und nicht fördert (Bozzo *et al.* 2016, Guerrero *et al.* 2016).

Die TDP-43-Ubiquitinierung ist in einem frühen Krankheitsstadium selten zu beobachten, erst mit dem Fortschreiten der Erkrankung kann Ubiquitin in TDP-43-positiven Einschlüssen detektiert werden (Lagier-Tourenne *et al.* 2010, Lee *et al.* 2011A, Guerrero *et al.* 2016). Aus diesem Grund handelt es sich bei dieser Form der Modifikation vermutlich um ein spätes Krankheitsereignis, dessen genaue Rolle noch nicht vollständig verstanden wird (Lee *et al.* 2011A, Guerrero *et al.* 2016). Jedoch dient die Ubiquitinierung als Signal für den Abbau von TDP-43 über die Autophagie und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Scotter *et al.* 2014).

TDP-43 enthält drei Schnittstellen für die Caspase 3, die das Protein in 25 bzw. 35 kDa große C-terminale Fragmente spaltet (Lee *et al.* 2011A, Huang *et al.* 2014, Guerrero *et al.* 2016). Vermutlich handelt es sich bei den Fragmenten um proteolytische Spaltprodukte, die bei der Beseitigung des Vollängenproteins entstehen (Lee *et al.* 2011A, Huang *et al.* 2014, Guerrero *et al.* 2016). Pathologische Einschlüsse bei ALS-Patienten enthalten ein Gemisch aus normal langem TDP-43 und gekürzten Varianten (Lee *et al.* 2011A).

Die Bildung von TDP-43-Aggregaten kann experimentell durch verschiedene Stimuli, wie oxidativen Stress oder durch die Hemmung der Proteinabbauwege, gesteigert werden (Bozzo *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016). Die Bedeutung der Aggregate beim ALS- und FTL-D-Krankheitsprozess ist noch nicht endgültig geklärt (Ratti und Bugatti 2016). Zum einen können die Aggregate schädlich wirken, indem sie direkt zelluläre Toxizität induzieren oder der Zelle aktiv lebensnotwendige Proteine „entziehen“ (Dantuma und Bott 2014, Cascella *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016). Dabei werden nicht nur TDP-43 und FUS/TLS durch deren

Selbstaggregation der Zelle entzogen, sondern deren Aggregate können auch andere RNA-bindende Proteine (RBPs) und mRNAs vereinnahmen (Li *et al.* 2013, Ratti und Bugatti 2016). Aus diesem Grund wird eine normale RNA-Homöostase verhindert. Lebensnotwendige Prozesse, wie die Translation von mRNAs, die für das Zellüberleben und die -erholung wichtig sind, sowie deren Prozessierung, Abbau und Sortierung durch die RBPs können nicht im vollen Umfang durchgeführt werden und steigern den Neuronenverlust und die Zelltodrate (Li *et al.* 2013). Des Weiteren konnten Woerner *et al.* (2016) zeigen, dass zytoplasmatische TDP-43-Aggregate den Export von mRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma stören und eine Fehllokalisierung und Aggregation zellulärer Transportfaktoren verursachen.

Allerdings bedingen Aggregate im Zytoplasma nicht zwangsläufig eine Toxizität. Erst wenn TDP-43 seine C-terminale Region und mindestens ein RRM besitzt, ist das Konstrukt in der Lage toxische Aggregate zu bilden (Johnson *et al.* 2008, Armakola *et al.* 2011, Li *et al.* 2013, Cascarina und Ross 2014, Lee und Kim 2015). Darüber hinaus könnten TDP-43-Aggregate auch eine protektive Position einnehmen, indem sie mutierte Proteine zurückhalten, bevor sie durch den Abbau toxisch in der Zelle wirken (Ratti und Bugatti 2016). Dies ist z. B. bei primären Neuronen der Fall, die ein mutiertes Fragment des Huntingtin Proteins exprimieren. Bei diesen steigt das Überleben durch die Bildung von Aggregaten (Arrasate *et al.* 2004).

#### 1.2.4 Bedeutung der TARDBP-Mutationen in der Pathogenese

Die TDP-43-Pathologie tritt, wie bereits erwähnt, zum großen Teil unabhängig von einer Genmutation auf. Eine strukturelle Proteinveränderung ist daher nicht notwendig, um den pathogenen Mechanismus in Gang zu setzen (Kabashi *et al.* 2008). Ferner sind Mutationen auch deswegen selten, da bereits kleinste negative oder positive Veränderungen in der TDP-43-Expression für die Zelle extrem schädlich sind (Buratti 2015). Mutationen in TARDBP wurden ausschließlich bei ALS- und FTLD-Patienten gefunden (Da Cruz und Cleveland 2011). Jedoch konnten nur 3-5% der fALS und 1-5% der sALS-Fälle auf eine TDP-43-Mutation zurückgeführt werden (Ling *et al.* 2013, Buratti 2015, Morgan und Orrell 2016, Ratti und Bugatti 2016, Prpar Mihevc *et al.* 2017). Trotz allem revolutionierte die Entdeckung der TARDBP-Mutation im Zusammenhang mit der Krankheitsursache die ALS-Forschung und fokussierte die Aufmerksamkeit auf die RNA-bindenden Proteine und die RNA-Prozessierung (Ling *et al.* 2013, Ratti und Bugatti 2016). Sreedharan und Mitarbeiter (2008) beschrieben die ersten beiden krankheitsassoziierten TDP-43-Varianten. Bis heute ist die Anzahl auf 52 Missens-Mutationen, eine Abbruch-Mutation und eine

Insertions-/Deletions-Mutation (Stand 2015) gestiegen (Buratti 2015, Ratti und Bugatti 2016). Die meisten Genmutationen treten im Exon 6 und somit im C-Terminus vom TDP-43 auf (Pesiridis *et al.* 2009, Lee *et al.* 2011A, Grad *et al.* 2015). Besonders häufig kommt es zu Substitutionen der Serin- und Threoninreste (Guerrero *et al.* 2016). Der Austausch von Methionin gegen Valin an Position 337 (M337V) ist die häufigste krankheitsassoziierte TDP-43-Variante (Guerrero *et al.* 2016). Sie konnte in 11 Patienten mit fALS nachgewiesen werden (Pesiridis *et al.* 2009, Buratti 2015). Der Vererbungsgang ist autosomal-dominant (Lee *et al.* 2011A, Grad *et al.* 2015, Morgan und Orrell 2016). Die in einem einzigen sALS-Fall beschriebene TDP-43-Q331K-Variante ist durch den Austausch von Glutamin gegen Lysin an Position 331 gekennzeichnet (Pesiridis *et al.* 2009, Buratti 2015). Die meisten Mutationen bedingen hauptsächlich eine *gain-of-function*. Die *gain-of-function* oder der toxische Hinzugewinn einer Funktion beschreibt die Bildung von potenziell schädlichem TDP-43 im Zytoplasma (Casella *et al.* 2016). Im Gegensatz dazu definiert die *loss-of-function* bzw. der Funktionsverlust die Abnahme von funktionellem TDP-43 im Zellkern und möglicherweise auch im Zytoplasma (Li *et al.* 2013, Casella *et al.* 2016). Krankheitsassoziierte TDP-43-Varianten haben eine gesteigerte Aggregationsneigung und Halbwertszeit. Des Weiteren verändern sie die subzelluläre Lokalisation (mutiertes TDP-43 ist verstärkt im Zytoplasma lokalisiert) und die Protein-Protein-Interaktionen. Sie haben Einfluss auf die Morphologie der SG (steigern die Anzahl, die Größe und deren Beständigkeit), auf die mitochondriale Funktion und Dynamik sowie auf den Proteintransport zwischen ER und Golgi. Überdies stört mutiertes TDP-43 den Transport der mRNA, bedingt vermehrt oxidativen Stress und potenziert die TDP-43-bedingte Zytotoxizität (Johnson *et al.* 2009, Ling *et al.* 2010, Braun *et al.* 2011, Li *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Aulas und Vande Velde 2015, Buratti 2015, Fukunaga *et al.* 2015, Lee und Kim 2015, Soo *et al.* 2015, Guerrero *et al.* 2016, Iguchi *et al.* 2016, Morgan und Orrell 2016, Ratti und Bugatti 2016, Ederle und Dormann 2017). Die Depletion von TDP-43 aus dem Zellkern scheint ein frühes Ereignis der ALS-Pathologie zu sein und konnte im Zentralnervensystem von ALS- und FTLN-Patienten beobachtet werden (Lee *et al.* 2011A, Belzil *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Casella *et al.* 2016, Morgan und Orrell 2016, Taylor *et al.* 2016). Der eindeutig krankheitsrelevante Verlust von TDP-43 im Zellkern geht einher mit Störungen der Transkription, des Spleißens und der miRNA-Biogenese (Lee *et al.* 2011A, Belzil *et al.* 2013, Ling *et al.* 2013, Casella *et al.* 2016, Morgan und Orrell 2016, Taylor *et al.* 2016, Ederle und Dormann 2017). Wahrscheinlich sind dies die Ursachen für die beobachteten zellulären Beeinträchtigungen und die abnormen morphologischen

Veränderungen. So führt die Depletion von TDP-43 in Modellsystemen zu einer Verzögerung der SG Assemblierung und zur Beschleunigung der Disassemblierung (Stabilität ist limitiert) (Li *et al.* 2013, Aulas und Vande Velde 2015). Eine Schlüsselkomponente der SG-Dynamik ist das RNA-bindende Protein G3BP1. Dessen Proteinlevel ist bei depletiertem TDP-43 herunterreguliert (Aulas und Vande Velde 2015). Der Mangel an funktionstüchtigen SGs könnte die erhöhte Anfälligkeit von Neuronen-ähnlichen Zellen gegenüber oxidativem Stress erklären (Aulas und Vande Velde 2015). Hierbei ist zu vermuten, dass vermehrt mRNAs bei einer Stressinduktion geschädigt werden. Neben der Modifikation der SGs hat der Funktionsverlust von TDP-43 möglicherweise Auswirkungen auf die Autophagie und das UPS. TDP-43 reguliert das Autophagie-relevante Protein Atg7 (Bose *et al.* 2011). Bei einer TDP-43-Depletion sinkt das Level an Atg7, welches zu einer Störung der Autophagie und zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen in der Zelle führt (Bose *et al.* 2011, Belzil *et al.* 2013). Ferner scheint die Abnahme des TDP-43-Levels auch zytoplasmatische Funktionen des Proteins zu beeinträchtigen. So konnte in Rückenmarksproben von ALS-Patienten ein modifizierter Transport und eine veränderte Translation der Map1 mRNA nachgewiesen werden (Ederle und Dormann 2017). Somit ist sehr wahrscheinlich, dass sowohl die *gain-of-function* als auch die *loss-of-function* für die Zelle toxisch sind und dass die Kombination die TDP-43-Pathologie begünstigt (Lee *et al.* 2011A, Ling *et al.* 2013, Cascella *et al.* 2016). Es ist daher lebenswichtig, dass TDP-43 in der Zelle genauestens reguliert wird (Ratti und Bugatti 2016).

### 1.2.5 Prion-ähnliche Verbreitung der TDP-43-Proteinopathien

Das Ausbreitungsmuster innerhalb der TDP-43-Proteinopathien wird oftmals als Prion-ähnlich definiert (Cascarina und Ross 2014). Hierbei erfolgt nach Proteinfehlfaltung und -aggregation die Übertragung der TDP-43-Oligomere von Zelle zu Zelle über Mikrovesikel oder Exosomen (Cascarina und Ross 2014, Grad *et al.* 2015, Iguchi *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016, Melentijevic *et al.* 2017). Die Pinozytose unterstützt hierbei die Aufnahme von TDP-43 in die Nachbarzelle. Innerhalb der Zelle sind die TDP-43-Aggregate in der Lage eine Fehlfaltung von normalstrukturierten TDP-43-Monomeren zu induzieren (Lee und Kim 2015). Dies erklärt möglicherweise den typischen Beginn der TDP-43-Proteinopathien an einem Krankheitsherd und deren schnelle horizontale bzw. vertikale Ausbreitung (Grad *et al.* 2015, Iguchi *et al.* 2016, Ratti und Bugatti 2016). Dessen ungeachtet ist eine Übertragung von Mensch zu Mensch, wie bei einer klassischen Prionenerkrankung, nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich (Cascarina und Ross 2014, Lee und Kim

2015). Ferner können TDP-43-Aggregate keine anderen ALS-assoziierten Proteine, wie z. B. SOD1, zur Aggregation verleiten (Polymenidou und Cleveland 2011).

Eine ausführliche und lückenlose Erforschung der molekularen Ursachen und Folgen der TDP-43-Proteinopathien gelingt nur unter Verwendung von unterschiedlichen Modellsystemen und -organismen, darunter der eukaryotische Einzeller *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.3 Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Modellorganismus

Die etabliertesten Modelle zur Untersuchung der neurodegenerativen Erkrankungen und im Speziellen der TDP-43-Proteinopathien sind verschiedene Zelllinien und transgene Organismen, wie die Maus *Mus musculus*, die Ratte *Rattus norvegicus*, der Zebrafisch *Danio rerio*, die Fliege *Drosophila melanogaster*, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und die Knospungshefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Die TDP-43-Proteinopathien werden durch die Überexpression von wildtypischem, mutiertem oder fragmentiertem TDP-43 im Modell reproduziert (Braun *et al.* 2011, Cascella *et al.* 2016). Dadurch kann die *gain-of-function* des Proteins nachgeahmt werden. Die Erforschung der *loss-of-function* wird durch den *knockdown* der TDP-43-codierenden mRNA durch siRNA ermöglicht (Cascella *et al.* 2016). Das vollständige Ausschalten des TARDBP-Gens ist im transgenen Tiermodell letal (Sephton *et al.* 2010).

Die Überexpression von TDP-43 in den Zellsystemen und Modellorganismen bedingt verschiedene pathophysiologische Effekte, welche in ALS-Patienten charakteristisch sind. So konnte in Zelllinien eine nukleäre Depletion des Proteins, dessen zytoplasmatische Akkumulation, eine gestörte mitochondriale Funktion und Morphologie sowie eine zelluläre Toxizität beobachtet werden (Hong *et al.* 2012, Cascella *et al.* 2016). Ferner bedingt die Synthese von exogenem TDP-43 im transgenen Organismus die Bildung von pathologischen, ubiquitinierten Proteinaggregaten in den Motoneuronen, neuronalen Zellverlust bzw. Reduktion von dendritischen Verzweigungen sowie einen progressiven, neurodegenerativen Phänotyp (motorische und kognitive Störungen) (Wegorzewska *et al.* 2009, Braun *et al.* 2011, Da Cruz und Cleveland 2011, Joyce *et al.* 2011, Turner *et al.* 2013, Buratti 2015, Cascella *et al.* 2016). Erstaunlicherweise verursacht das selektive Entfernen von TDP-43 ähnliche pathologische Merkmale wie die *gain-of-function*, das heißt die Ausbildung zytotoxischer zytoplasmatischer TDP-43-Aggregate. Es wurde eine induzierte Toxizität, altersabhängige, progressive Degeneration der Motoneuronen, Bewegungsdefizite und eine teilweise reduzierte Lebensspanne festgestellt (Da Cruz und Cleveland 2011, Lee *et al.* 2011A, Ling *et al.* 2013,

Romano *et al.* 2014, Cascella *et al.* 2016). Es steht außer Frage, dass die transgenen Tiermodelle zur Aufklärung von Krankheitsmechanismen beitragen. Allerdings sollten die Nachteile und Unstimmigkeiten zwischen Modell und Patient nicht außer Acht gelassen werden. Zum einen spielt sich der pathophysiologische Verlauf im Modell in einem relativ kurzen Zeitraum ab, während beim Menschen Jahrzehnte bis zum Krankheitsausbruch vergehen (Turner *et al.* 2013). Zum anderen wird der Fokus stark auf mutiertes TDP-43 gelegt. Jedoch fußt die Krankheitsentwicklung auf mehreren Faktoren und nur selten auf einer Mutation (Joyce *et al.* 2011, Turner *et al.* 2013). Nur die übermäßige Expression von TDP-43 ist im transgenen Tier toxisch und bedingt einen pathologischen Phänotyp (Joyce *et al.* 2011). Dies könnte zum Nachteil haben, dass zelluläre Wege aktiviert werden, die keine Relevanz für den ALS-Patienten haben oder dass das exogene TDP-43 zu einer Herunterregulation von endogenem TDP-43 führt (Joyce *et al.* 2011). Darüber hinaus gibt es bis heute keine Belege, dass das Expressionslevel von TDP-43 im ALS-Patienten verändert ist (Joyce *et al.* 2011). Auffällig ist ebenso, dass speziell in der Maus nur sehr selten zytoplasmatische TDP-43-positive Aggregate aufzufinden sind (Da Cruz und Cleveland 2011, Cascella *et al.* 2016). Dies ist allerdings ein wesentliches Merkmal der TDP-43-Proteinopathien. Auch ist eine Übertragung der Resultate von der Maus zum Menschen auf Grund der Unterschiede in der Lebenserwartung, Neuroanatomie, Pharmakokinetik und -dynamik schwierig (Turner *et al.* 2013).

Daher ist die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wegen der zahlreichen Vorteile gegenüber den anderen Zellsystemen und transgenen Organismen eine sinnvolle Alternative. Technisch gesehen genügen bei der Hefe einfache sterile Anforderungen und günstige Wachstumsmedien, um eine schnelle Kultivierung zu erzielen (Tenreiro *et al.* 2013). Auch die schnelle Generationszeit, die leichte genetische Manipulierbarkeit und die Möglichkeit der langen Lagerung sind eindeutige Vorzüge dieses Organismus gegenüber anderen (Armakola *et al.* 2011, Tenreiro *et al.* 2013). Die gute Charakterisierung des Hefegenoms spiegelt sich in der Existenz von zahlreichen Deletions-, cDNA- und Überexpressionsstämmen bzw. -bibliotheken wieder (Johnson *et al.* 2008, Braun *et al.* 2010, Armakola *et al.* 2011). Ferner besitzt die Hefe ein großes Potenzial bei der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen auf Grund deren Einsatzmöglichkeit in genetischen Hochdurchsatzscreens und bei pharmakologischen Ansätzen (Kryndushkin und Shewmaker 2011, Tenreiro *et al.* 2013). So konnte mittels der Hefe das ALS-assoziierte Protein TAF15 identifiziert werden (Couthouis *et al.* 2011). Überdies dient Hefe als Modellorganismus zum Validieren neuer, möglicherweise therapeutisch einsetzbarer Substanzen (Prasad *et al.* 2016). Aber nicht nur die

hohe Anwenderfreundlichkeit der Hefe, sondern auch ihre biologischen Eigenschaften sprechen für die Hefe als Modellorganismus. So handelt es sich um einen sehr einfachen Organismus, dessen Genom wenige Introns enthält und sehr kompakt ist (Braun *et al.* 2010, Bastow *et al.* 2011, Tenreiro *et al.* 2013). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Hefe der erste eukaryotische Organismus war, dessen Genom vollständig sequenziert werden konnte (Tenreiro *et al.* 2013).

Ungefähr ein Drittel der Hefegene haben ein direktes Homolog im Menschen. Die restlichen zwei Drittel besitzen Domänen, welche signifikant homolog zu mehreren humanen Genen sind (Kryndushkin und Shewmaker 2011). Kachroo *et al.* (2015) zeigten, dass etwa die Hälfte der Hefegene funktionell durch humane Homologe ersetzt werden können. Bei Faltung, Sortierung und Abbau von Proteinen waren es sogar fast zwei Drittel. Die Stammfunktion vieler Gene und Proteine blieb also trotz mehrerer Millionen Jahre der Entwicklung erhalten. Ungefähr 290 Gene in der Hefe sind ortholog zu menschlichen Krankheitsgenen (Sarto-Jackson und Tomaska 2016). Aber nicht nur einzelne Gene bzw. Proteine, sondern gesamte zelluläre Prozesse und molekulare Mechanismen sind zwischen Hefe und Mensch evolutionär konserviert oder sind sich sehr ähnlich (Johnson *et al.* 2008, Armakola *et al.* 2011, Kryndushkin und Shewmaker 2011, Sarto-Jackson und Tomaska 2016). Grundlegende Mechanismen für Wachstum, Anpassung und Überleben sind in ein- und mehrzelligen eukaryotischen Organismen vergleichbar (Bastow *et al.* 2011). Auch Zellwege für die Signalweiterleitung, Zellmorphologie und Zell-zu-Zell-Kommunikation sind annähernd gleich (Sarto-Jackson und Tomaska 2016). Interessanterweise sind evolutionär „neue“ Spezifikationen des Nervensystems von sehr alten, fundamentalen Prozessen, die bereits in einzelligen eukaryotischen Organismen vorhanden sind, übernommen worden (Sarto-Jackson und Tomaska 2016). Speziell die Hefezellen können während des chronologischen Alterns in ein postmitotisches Stadium wechseln und so die Situation in den Neuronen nachahmen (Braun *et al.* 2010). Aber nicht nur physiologische, sondern auch krankheitsrelevante Prozesse sind zwischen Hefe und Mensch konserviert (Tenreiro *et al.* 2013). Da sich jede Zelle, von der einfachen Hefezelle bis zum komplexen humanen Neuron, mit fehlgefalteten und aggregierten Proteinen auseinandersetzen muss, haben sich grundlegende zelluläre Proteinfehlfaltungs- und Qualitätskontrollmechanismen kaum verändert (Armakola *et al.* 2011, Bastow *et al.* 2011, Kryndushkin *et al.* 2011, Tenreiro *et al.* 2013). Die Störung dieser Prozesse sowie weitere pathologische Merkmale, wie oxidativer und ER Stress, mitochondriale Schädigung, Zytotoxizität, Zellalterung und –tod können sowohl im Modellorganismus als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden (Braun

*et al.* 2010, Armakola *et al.* 2011, Braun 2015, Sarto-Jackson und Tomaska 2016). Auf Grund dieser Vorzüge ist die Knospungs-Hefe ein etabliertes und leistungsstarkes Modell zur Erforschung verschiedener Proteinopathien, wie beispielsweise den  $\alpha$ -Synucleinopathien, den Polyglutaminerkrankungen oder den TDP-43-Proteinopathien (Braun *et al.* 2010, Braun *et al.* 2011, Kryndushkin und Shewmaker 2011, Sarto-Jackson und Tomaska 2016).

Jedoch dürfen die offensichtlichen Nachteile der Hefe als Modellorganismus nicht außer Acht gelassen werden. Der einzellige Organismus ist nicht wie ein Neuron in ein Gewebe eingebettet und kann deshalb keine Zell-Zell-Interaktionsnetzwerke nachahmen (Braun *et al.* 2010, Kryndushkin und Shewmaker 2011). Die Hefe besitzt keine Neuronen-spezifischen morphologischen Strukturen, wie Dendriten, Axone oder Synapsen (Braun *et al.* 2010). Ferner passen sich Hefen an veränderte Umweltbedingungen rasch an und können sich teilen, während es sich bei den Neuronen um hochspezifische, differenzierte und postmitotische Zellen handelt (Braun *et al.* 2010). Auch besitzen Neuronen, im Vergleich zu Hefe, mehr Proteine, die am Zelltodmechanismus beteiligt sind (Braun *et al.* 2010).

Ein scheinbar großer Nachteil der Hefe bei der Erforschung der TDP-43-Proteinopathien ist die Tatsache, dass der Organismus kein Homolog für TDP-43 besitzt (Johnson *et al.* 2009). Jedoch wird auch in vielen anderen Modellen humanes TDP-43 überexprimiert, um einen pathologischen Phänotyp zu imitieren (siehe oben). Des Weiteren rekapituliert die Expression von menschlichem TDP-43 in der Hefe die krankheitsrelevanten Charakteristika in höheren Organismen und Patienten (Braun *et al.* 2011, Kryndushkin und Shewmaker 2011). Einerseits kann bei einer starken Synthese von TDP-43 die Translokation des Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma beobachtet werden (Johnson *et al.* 2008, Braun *et al.* 2011). Andererseits ist die dortige Aggregation und Toxizität abhängig von der C-terminalen Region und dem RRM (Johnson *et al.* 2008, Armakola *et al.* 2011, Braun *et al.* 2011). Die durch die TDP-43-Expression bedingte Toxizität im Hefekrankheitsmodell korreliert mit einer Reduktion des Wachstums (Abnahme des klonogenen Potenzials und Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Zellen) und bedingt zelluläre morphologische Veränderungen (Johnson *et al.* 2008, Braun *et al.* 2011). Die TDP-43-Aggregate unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von anderen aggregierenden Proteinen. So ist TDP-43 SDS-löslich und reagiert nicht mit Amyloid-diagnostischen Farbstoffen (Johnson *et al.* 2008, Johnson *et al.* 2009, Scotter *et al.* 2014). Die Synthese von mutiertem TDP-43 verstärkt die Aggregationsneigung, die Aggregationsanzahl und die Zytotoxizität (Johnson *et al.* 2009, Braun *et al.* 2011). All diese Merkmale wurden in höheren Organismen ebenfalls beobachtet. Darüber hinaus konnten mittels des Modellorganismus Hefe Stoffwechselprozesse und Gene identifiziert werden, die

als Modulatoren der TDP-43-bedingten Zytotoxizität dienen. Braun und Mitarbeiter (2011) zeigten, dass die mitochondriale Atmung die Toxizität in TDP-43-exprimierenden Hefezellen beeinflusst. Ferner konnten genetische Suppressoren und Verstärker der TDP-43-Toxizität in verschiedenen, pathologischen Hefemodellen erfolgreich auf andere Organismen, wie die Fliege und den Menschen, übertragen werden (Elden *et al.* 2010, Bastow *et al.* 2011, Lee *et al.* 2011B). Beispiele hierfür sind Pbp1 in der Hefe bzw. dessen humanes Homolog Ataxin-2 sowie das zum Spleißen benötigte Dbr1 Protein. Bei ersterem wurde 2010 gezeigt, dass die Überexpression oder die Deletion von Pbp1 die Zytotoxizität in TDP-43-synthetisierenden Hefezellen verstärkt bzw. reduziert (Elden *et al.* 2010). Die Erkenntnis, dass Pbp1 bzw. Ataxin-2 die TDP-43-bedingte Toxizität beeinflusst, konnte in Säugerzellkulturen (HeLa-Zellen), in *D. melanogaster* und im Menschen verifiziert werden (Elden *et al.* 2010, Lee *et al.* 2011B, Nihei *et al.* 2012). Auch bei Dbr1 handelt sich um einen Regulator der TDP-43-bedingten Zytotoxizität. Armakola *et al.* (2012) wiesen in einem genomweiten Screen nach, dass die Deletion des am Entzweigen von Lassointrons beteiligte Enzyms Dbr1 die durch TDP-43-verursachte Toxizität mindert. Die Wissenschaftler stellten die Theorie auf, dass die Lasso-RNA als „Köder“ für toxisches zytoplasmatisches TDP-43 dient und dadurch TDP-43 daran hindert, essentielle RNAs und Proteine zu binden. Dies wiederum bedingt ein positiveres Wachstum der Zelle. Die durch das Hefemodell erlangten Ergebnisse konnten in einer Zelllinie und in primären kortikalen Neuronen aus der Ratte bestätigt werden (Armakola *et al.* 2012).

Die aufgeführten Beispiele unterstreichen das große Potenzial der Hefe als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen und speziell für TDP-43-Proteinopathien. Hierbei stellt die fundierte Beteiligung der mitochondrialen Atmung nur eine Facette des pathologischen Prozesses dar. Die zelluläre Eliminierung von potenziell schädlichen Proteinen wie z. B. TDP-43 durch proteolytische Abbauewege ist ein weiterer, zentraler Aspekt der TDP-43-Proteinopathien und aller sonstigen, neurodegenerativen Erkrankungen (siehe Abschnitt 1.1). Dabei ist es von großem Vorteil, dass die Maschinerie für die Proteinfehlfaltung, Qualitätskontrolle und Proteinabbau zwischen Hefe und Mensch evolutionär konserviert ist. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die in der Hefezelle entwickelten Überlebensstrategien auf humane Motoneuronen übertragen werden können.

## 1.4 Zelluläre proteolytische Mechanismen

Die im Zentralnervensystem befindlichen Neuronen und Synapsen sind außerordentlich stark auf die zuverlässige Synthese und den zügigen Abbau von Proteinen angewiesen. Dies liegt

zum einen darin begründet, dass die Regenerationsfähigkeit der Nervenzellen auf Grund der eingeschränkten adulten Neurogenese stark limitiert ist (Opattova *et al.* 2015). Das beschränkt die Möglichkeiten der Zelle, überflüssige, geschädigte, fehlgefaltete oder aggregierte Proteine zu eliminieren (Wong und Cuervo 2010). Zum anderen dienen die Proteine in den Synapsen als Moleküle für die Signaltransduktion, weswegen eine korrekte Proteinsynthese und Abbau wichtig für die Plastizität und das Gedächtnis sind (Tai und Schuman 2008, Wong und Cuervo 2010). Die einzigartige Proteinzusammensetzung in den Synapsen benötigt darüber hinaus ein komplexes und modifizierbares System der Proteinqualitätskontrolle (Atkin und Paulson 2014).

Der zelluläre Proteinabbau erfolgt im Wesentlichen über drei Mechanismen: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), die Autophagie und das endosomal-lysosomale (in der Hefe das endosomal-vakuoläre) System.

#### 1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Neben der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität und der selektiven Eliminierung von unerwünschten Proteinen in Zellkern und Zytoplasma reguliert das UPS auch Protein-Protein-Interaktionen (Atkin und Paulson 2014, Finley *et al.* 2012, Dantuma und Bott 2014, Opattova *et al.* 2015). Ferner ist das UPS an der allgemeinen Zellgesundheit beteiligt, indem es Rezeptorsignalwege, zelluläre Reaktionen auf oxidativen Stress und DNA-Schädigung sowie die Zellzyklusprogression vermittelt (Atkin und Paulson 2014).

Das UPS besteht aus zwei Teilschritten: dem Markieren der Zielproteine mit Ubiquitin und deren Abbau im Proteasom (Dantuma und Bott 2014). Die Kennzeichnung der Substratproteine ist ein enzymatischer kaskadenartiger Prozess und besteht aus drei Stufen (Finley *et al.* 2012, Atkin und Paulson 2014, Dantuma und Bott 2014). Bei der ersten erfolgt die Aktivierung von Ubiquitin durch das Enzym E1 (in der Hefe ausschließlich Uba1) unter Verbrauch von ATP (Finley *et al.* 2012, Atkin und Paulson 2014). Das evolutionär stark konservierte Ubiquitinmolekül besteht aus 76 Aminosäuren, enthält sieben Lysinreste und wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert (Atkin und Paulson 2014, Braun 2015). Beim zweiten Schritt, der Ubiquitinkonjugation, wird das Protein auf ein E2 Enzym übertragen (Finley *et al.* 2012, Atkin und Paulson 2014, Dantuma und Bott 2014). In der Hefe sind 11 E2 Enzyme bekannt (Finley *et al.* 2012). Bei der letzten Stufe erfolgt die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Zielprotein mit Hilfe einer E3-Ligase (Finley *et al.* 2012, Atkin und Paulson 2014). Die E3-Ligasen werden in Abhängigkeit ihrer Domäne in drei Klassen gruppiert: RING-, HECT- oder E3-Enzyme mit multiplen Untereinheiten (Atkin und Paulson 2014). Das

Ubiquitin wird primär mit den Lysinseitenketten des Substratproteins verknüpft, welches mono-, multi- oder polyubiquitiniert werden kann (Atkin und Paulson 2014, Finley *et al.* 2012, Braun 2015). Die Polyubiquitinkette wird durch mehrere Zyklen der Ubiquitinierung synthetisiert (Dantuma und Bott 2014). Die Art der Ubiquitinierung und die Topologie der Polyubiquitinkette bestimmen das Schicksal des Proteins. So fördert die Monoubiquitinierung den proteasomalen Abbau, aber auch die Proteinlokalisierung, Proteinaktivierung und Transkription sowie den proteolytischen Abbau über die Autophagie oder über die Endozytose (Dantuma und Bott 2014). Eine K48-verknüpfte Ubiquitinkette markiert das Protein meist für den Abbau im Proteasom, bestimmt dessen Lokalisation und Aktivität (Finley *et al.* 2012, Dantuma und Bott 2014). Wird das Zielprotein mit einer K63-verbundenen Ubiquitinkette posttranslational modifiziert, so ist dieses für die DNA-Reparatur, den zellulären Transport oder für die Proteolyse über die Autophagie oder die Endozytose markiert (Finley *et al.* 2012, Dantuma und Bott 2014). Im zweiten Schritt des UPS werden die gekennzeichneten Proteine dem Proteasom zugeführt. Der evolutionär konservierte 26S große Multiproteinkomplex setzt sich aus einem proteolytisch aktiven 20S Kernkomplex und zwei 19S Regulationskomplexen zusammen (Finley *et al.* 2012, Dantuma und Bott 2014). Diese befinden sich an beiden Enden des Kerns und dienen der Substraterkennung (Finley *et al.* 2012, Dantuma und Bott 2014). Das Proteasom entfaltet das Substrat, führt die Polypeptidkette durch seinen inneren Kanal und spaltet diese in kurze Peptide. Die Peptide werden anschließend von zellulären Aminopeptidasen zu Aminosäuren prozessiert und recycelt (Dantuma und Bott 2014). Das Ubiquitin wird vor dem Einschleusungsprozess von Deubiquitinasen (DUBs) wieder entfernt und dem zellulären Pool zur Verfügung gestellt (Atkin und Paulson 2014, Braun 2015). Freies, Protein-ungebundenes Ubiquitin kann in der Zelle verschiedene Prozesse, wie die Kinase-Aktivierung beeinflussen (Atkin und Paulson 2014). Die Regulation der proteasomalen Aktivität erfolgt durch den Transkriptionsfaktor Rpn4 (Finley *et al.* 2012). Das Protein steuert durch seine DNA-Bindung Gene, die für Komponenten des Proteasoms codieren (Finley *et al.* 2012). Bei hohem Rpn4-Level steigt die Transkription der Proteasomuntereinheiten und damit die Aktivität des Multiproteinkomplexes (Finley *et al.* 2012). Eine gesteigerte Proteasomkapazität verlängert die replikative Lebensspanne und die Fitness von Hefezellen (Braun 2015). Eine gestörte oder gehemmte Proteasomleistung führt zur Beeinträchtigung der Aminosäurehomöostase, zur Proteinaggregation, Zytotoxizität und zum Zelltod (Atkin und Paulson 2014, Braun 2015). Infolgedessen kommt es zum Verlust der synaptischen Plastizität, zum Neuronenverlust und zum Ausbruch neurodegenerativer Erkrankungen (Atkin und Paulson 2014). Mehrere Studien

konnten belegen, dass das UPS am Abbau von TDP-43 beteiligt ist und dass eine Hemmung des Mechanismus zum Anstieg des TDP-43-Levels und zur Bildung von TDP-43-positiven Aggregaten führt (Wang *et al.* 2010, Urushitani *et al.* 2010, Huang *et al.* 2014, Scotter *et al.* 2014). Hefekrankheitsmodelle für TDP-43 könnten zudem zur Unterscheidung der Ubiquitin-modulierenden Prozesse (darunter UPS, Autophagie und Endozytose) im Zusammenhang mit der TDP-43-bedingten Zytotoxizität, Zelltod und Neuronenverlust beitragen (Braun 2015).

## 1.4.2 Die Autophagie

### 1.4.2.1 Überblick und Definition

Während beim UPS einzelne, spezifisch markierte Proteine abgebaut werden, erfolgt bei der Autophagie die Eliminierung zellulärer Komponenten *en masse* (Klionsky und Schulman 2014). Darüber hinaus werden beim autophagisch-vakuolären Prozess vor allem überflüssige und beschädigte Organellen sowie langlebige, fehlgefaltete und aggregierte Proteine bzw. Proteinkomplexe aus der Zelle entfernt. Das UPS hingegen reduziert besonders kurzlebige und lösliche Proteine (Huang *et al.* 2014, Scotter *et al.* 2014, Opattova *et al.* 2015, Wen und Klionsky 2016).

Der Begriff Autophagie leitet sich aus dem Altgriechischen ab und bedeutet so viel wie „sich selbst verspeisend/verzehrend“ (Klionsky 2007, Boya *et al.* 2013, Wen und Klionsky 2016). 1963 verwendete de Duve erstmals diesen Begriff, um spezielle morphologische Mechanismen in der Zelle zu beschreiben (Klionsky 2007). Es handelt sich hierbei um einen stark regulierten, evolutionär konservierten Abbau- und Recyclingprozess, der in allen Eukaryoten vorkommt und ein integraler Bestandteil der normalen Zellfunktion ist (Klionsky 2007, Zappavigna *et al.* 2013, Wen und Klionsky 2016). Die Autophagie ist ein konstitutiver Prozess, d.h. er erfolgt zu einem gewissen Grad bei normalen Wachstumsbedingungen (Cvt-Weg) (*Cytoplasm-to-Vacuole Targeting*) (Baixauli *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Allerdings wird der Mechanismus u. a. bei Nährstoff- und Energiemangel sowie bei veränderten Umwelt- oder Entwicklungsbedingungen massiv induziert (Klionsky 2007, Zappavigna *et al.* 2013, Baixauli *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Die über die Autophagie abzubauenen, zytoplasmatischen Bestandteile werden in das Lysosom (bei höheren Eukaryoten) oder in die Vakuole (bei Hefe) befördert und zu recycelbaren Makromolekülen prozessiert (Boya *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016).

#### 1.4.2.2 Arten der Autophagie

Die ersten 15 an der Autophagie beteiligten *ATG* (*AuTophagy-related*) Gene bzw. deren Produkte wurden zuerst von Tsukada und Ohsumi (1993) im Modellorganismus Hefe beschrieben. Bis heute dient die Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Grundlage für die Erforschung der Autophagie im Säugersystem (Klionsky 2007, Zappavigna *et al.* 2013). Die Anzahl der Autophagie-relevanten Proteine beläuft sich auf aktuell 41 (Wen und Klionsky 2016). 16 dieser 41 Atg Proteine bilden die sogenannte autophagische Kernmaschinerie (Wen und Klionsky 2016). Sie werden zur Bildung des Autophagosoms benötigt und sind an fast allen Typen der Autophagie beteiligt (Inoue und Klionsky 2010, Feng *et al.* 2014, Huber und Teis 2016, Wen und Klionsky 2016).

Die Autophagie kann in drei Gruppen untergliedert werden: die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA), die Mikroautophagie und die Makroautophagie (Wong und Cuervo 2010, Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014 Wen und Klionsky 2016).

Beim Erstgenannten werden die Zielproteine auf Grund eines spezifischen Motivs (KFERQ) durch das Chaperon Hsc70 erkannt und gebunden (Huber und Teis 2016). Das Chaperon entfaltet die Proteine und transportiert sie mit Hilfe des Membrantransporters LAMP-2A (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 2A*) in das Lysosom (Huber und Teis 2016). Die CMA kommt in der Hefe nicht vor (Boya *et al.* 2013, Wen und Klionsky 2016).

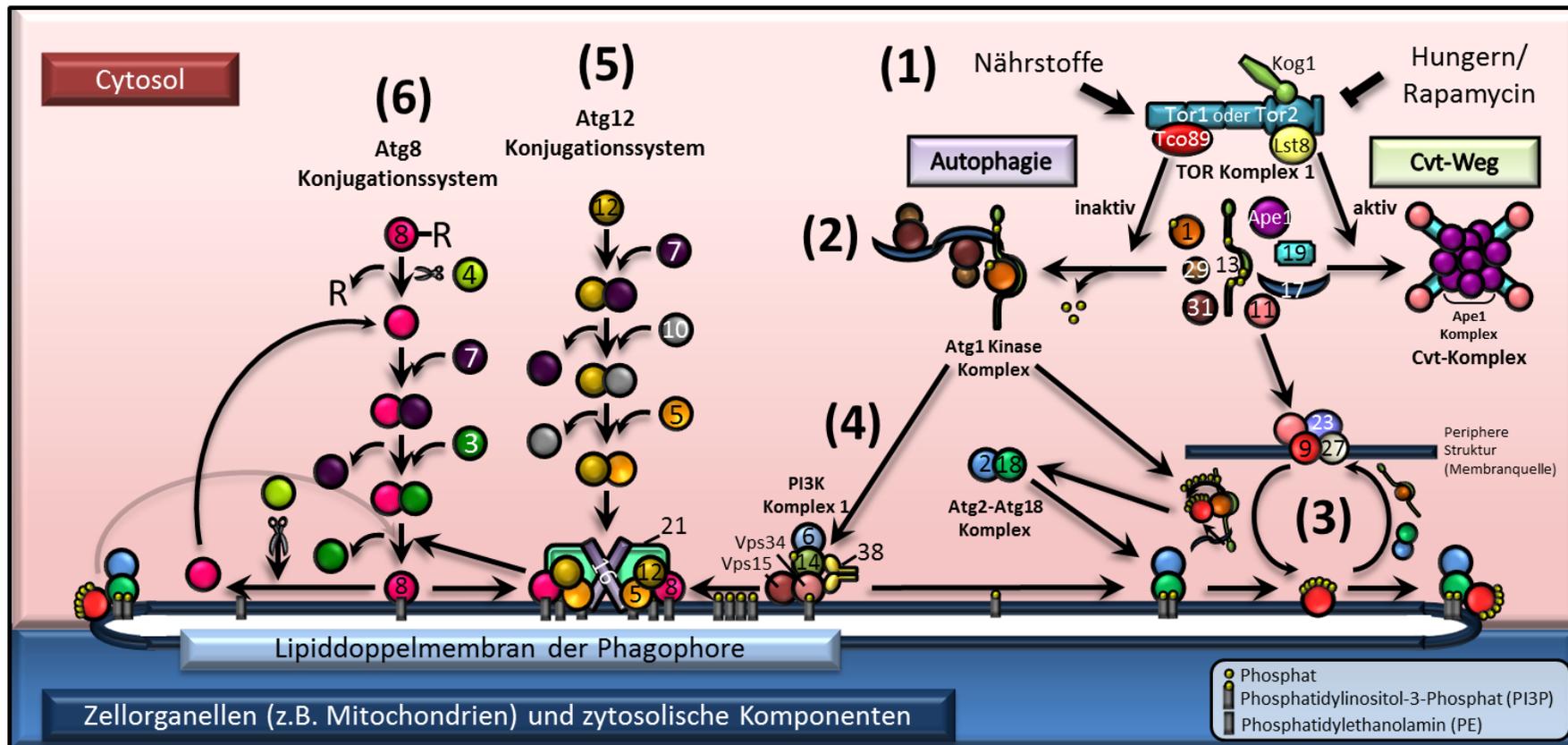
Bei der Mikroautophagie werden die Substrate direkt durch die Ein- oder Ausstülpung des Lysosoms oder der Vakuole aufgenommen und abgebaut (Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Die Makroautophagie wird häufig mit dem Begriff Autophagie gleichgesetzt und zeichnet sich durch die Bildung eines Autophagosoms aus. Das aus einer Doppelmembran bestehende Vesikel wird durch das Verschließen der Phagophore gebildet und dient der Selektion der zytosolischen Strukturen, wie Organellen oder Proteinen (Boya *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Klionsky und Schulman 2014, Braun 2015, Wen und Klionsky 2016). In Abhängigkeit davon, ob die Absonderung auf spezielle Komponenten abzielt oder nicht, kann die Makroautophagie, ebenso wie die Mikroautophagie, in einen selektiven bzw. in einen nichtselektiven Mechanismus unterteilt werden (Bryant und Stevens 1998, Klionsky 2007). So bezeichnet man den Abbau von Mitochondrien als Mitophagie bzw. die Eliminierung von Peroxisomen als Pexophagie (Wen und Klionsky 2016). Die Grundlage der selektiven Autophagie beruht auf den Einsatz von individuellen Rezeptor- und Adapterproteinen (Boya *et al.* 2013, Klionsky und Schulman 2014, Braun 2015, Wen und Klionsky 2016).

### 1.4.2.3 Molekulare Mechanismen der Autophagie

Ungeachtet der Ladung erfolgt die Makroautophagie in mehreren Stufen: 1. Induktion, 2. Kernbildung, 3. Expansion und Komplettierung, 4. Andocken und Fusion und 5. Abbau und Abgabe (Wen und Klionsky 2016). Die Induktion der Autophagie beginnt in der Hefe an einer einzelnen peri-vakuolären Stelle, der sogenannten Phagophor-Assemblierungsstelle (PAS) (Huber und Teis 2016, Wen und Klionsky 2016). Deren Protein- und Membranzusammensetzung sowie der Grund für die Nähe zur Vakuole sind unbekannt (Feng *et al.* 2014). Ferner konnte bis heute kein Äquivalent im Säuger beobachtet werden (Feng *et al.* 2014, Huber und Teis 2016).

Das erste Protein an der Phagophor-Assemblierungsstelle, Atg11, ist für die Rekrutierung des Atg1-Komplexes, ein Kernmechanismus, an die PAS zuständig (Wen und Klionsky 2016). Der Atg1-Komplex reguliert die Autophagieinduktion und kann durch TORC1 (*Target Of Rapamycin Complex 1*) gesteuert werden (Abb. 5) (Huber und Teis 2016, Wen und Klionsky 2016). TORC1 ist eine 290 kDa große Serin-Threonin-Kinase, die im aktiven Zustand die Autophagie hemmt (Zappavigna *et al.* 2013). Allerdings können verschiedene Umwelteinflüsse das Enzym beeinflussen. So sorgen eine gute Nährstoffversorgung, Wachstumsfaktoren und das Hormon Insulin für eine Aufrechterhaltung der TORC1-Aktivität (Klionsky 2007, Zappavigna *et al.* 2013). Sinken allerdings das Nährstoff- oder Energieangebot, wird vermehrt das Hormon Glukagon ausgeschüttet oder das Antibiotikum Rapamycin eingesetzt, erfolgt die TORC1-Inhibierung. Infolgedessen wird die Autophagie initiiert (Zappavigna *et al.* 2013, Klionsky und Schulman 2014, Huber und Teis 2016). Durch die Hemmung des TORC1 wird Atg13, als regulatorische Untereinheit des Atg1-Komplexes, teilweise dephosphoryliert und die Affinität zu Atg1 erhöht (Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014). Jedoch sind Atg1 und Atg13 nur zwei von insgesamt fünf Komponenten des Atg1-Komplexes. So kann Atg13 nicht nur mit der Serin-Threonin-Kinase Atg1 interagieren, sondern auch mit Atg17 (Feng *et al.* 2014, Suzuki *et al.* 2015, Wen und Klionsky 2016). Atg17 ist halbmondförmig gebogen und bildet mit Atg31 und Atg29 einen Komplex. Der Atg17-Atg31-Atg29-Komplex lagert sich zu einem Dimer in Form einer Welle oder eines „S“ zusammen und stellt das Gerüst des Atg1-Komplexes dar (Ragusa *et al.* 2012, Feng *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016).

Jedoch interagieren die Atg1-Komplexkomponenten nicht nur untereinander, sondern auch mit anderen Atg-Gruppen. So werden die für den zweiten Schritt der Autophagie benötigten Proteine durch Atg1, Atg13 und Atg17 zur PAS rekrutiert. Hierbei regulieren alle drei



**Abb. 5: Schritte der Phagorenamassemblierung.** Das Zusammenspiel zahlreicher Atg-Proteine ermöglicht die Etablierung, Erweiterung und den Zusammenschluss der Phagophoremembran. Die Autophagie kann durch das Angebot an Nährstoffen, Hormonen und durch das Antibiotikum Rapamycin reguliert werden. (1) Bei einer guten Nährstoffversorgung ist der TOR-Komplex 1 (TORC1), einer Serin-Threonin-Kinase, aktiv und der Abbau zellulärer Komponenten erfolgt in einem geringen Umfang über den Cvt-Weg. Hungerbedingungen und Rapamycin führen zu einer Hemmung von TORC1 und zu einer Aktivierung der Autophagie. (2) Während der Initiierung wird Atg13 teilweise dephosphoryliert und interagiert zusammen mit Atg1 und anderen Proteinen im Atg1-Kinase-Komplex. (3) Einige Komponenten des Komplexes und viele weitere Atg-Proteine, wie z. B. Atg2-Atg18, sind am Atg9-Zyklus beteiligt. Atg9 befördert Membranlipide und rekrutiert Atg8 und Atg18 zur PAS. (4) Atg13 mobilisiert Atg14 zur PAS. Atg14 ist ein Bestandteil des PI3K-Komplexes 1, der für die Synthese von PI3Ps zuständig ist. (5) + (6) Die Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme Atg8 und Atg12 ligieren Atg8 mit PE bzw. Atg12 mit Atg5 und Atg16. Der Atg12-Atg5-Atg16-Komplex unterstützt als E3-Enzym die Verknüpfung von Atg8 mit PE. Die Produkte der Konjugationssysteme verbinden sich zu einem Proteingerüst an der äußeren Membran der Phagophore. Weitere Einzelheiten und Abkürzungen sind im Text erläutert.

Proteine die Bewegung von Atg9 zwischen der PAS und der peripheren Stelle (Webber und Tooze 2010, Suzuki *et al.* 2013, Suzuki *et al.* 2015, Huber und Teis 2016, Wen und Klionsky 2016). Ferner ist Atg9 ein direktes Phosphorylierungsziel von Atg1 (Papinski *et al.* 2014). Neben der Rekrutierung von Atg9 ist Atg13 ebenso an der Einbeziehung des Klasse III Phosphoinositid-3-Kinase-Komplexes (PI3K-Komplex 1) über dessen Untereinheit Atg14 beteiligt (Jao *et al.* 2013, Wen und Klionsky 2016). Mittels dieser Atg-Gruppe erfolgt im zweiten Schritt der Autophagie, der Kernbildung, die Generierung der Phagophore (Wen und Klionsky 2016). Der PI3K-Komplex setzt sich aus Vps15, Vps34 (*Vacuolar Protein Sorting*), Atg6, Atg14 und Atg38 zusammen und ist für die Synthese von Phosphatidylinositol-3-Phosphaten (PI3P) zuständig (Wong und Cuervo 2010, Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Huber und Teis 2016). Durch deren Generierung werden andere PI3P-Proteine, wie Atg18, Atg20, Atg21, Atg24 und Atg27 zur PAS rekrutiert (Klionsky 2005, Feng *et al.* 2014). Das Transmembranprotein Atg9 ist sowohl an der Kernbildung als auch an der Erweiterung der Phagophore beteiligt (Wen und Klionsky 2016). Das Protein pendelt zwischen der PAS und der peripheren Struktur und beliefert die PAS mit Membranlipiden (Suzuki *et al.* 2013, Wen und Klionsky 2016). Dies fördert das Wachstum der Phagophore. Die exakte Quelle der Phagophorenmembran wird stark diskutiert. Möglichkeiten wären das ER, die Mitochondrien, der Golgi-Apparat oder die Plasmamembran (Mari *et al.* 2011, Suzuki *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Der Atg9-Zyklus wird von zahlreichen Proteinen reguliert. Neben den bereits erwähnten Proteinen Atg1, Atg13 und Atg17 werden Atg11, Atg23 und Atg27 sowie der Komplex Atg18-Atg2 für den Transport benötigt (Webber und Tooze 2010, Feng *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Auch der PI3K-Komplex ist indirekt durch Atg18-Atg2 beteiligt (Webber und Tooze 2010). Atg18-Atg2 ist über PI3P in der Phagophore verankert, jeweils am Ende der Isolationsmembran lokalisiert und mit Atg9 in einem Komplex gebunden (Webber und Tooze 2010, Watanabe *et al.* 2012, Suzuki *et al.* 2013, Papinski *et al.* 2014). Des Weiteren fördert die durch Atg1 initiierte Phosphorylierung von Atg9 die Rekrutierung von Atg18 und Atg8 zur PAS (Papinski *et al.* 2014).

Die Atg8 und Atg12 Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme sind für den dritten Schritt der Autophagie, der Expansion und der Komplettierung der Phagophore, essentiell (Zappavigna *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Huber und Teis 2016, Wen und Klionsky 2016). Die Konjugation von Atg8 mit Phosphatidylethanolamin (PE) sowie deren Integration in die äußere und innere Membran der Phagophore erfolgt schrittweise mit Hilfe mehrerer Atg-Proteine. Zunächst wird die im inaktiven Vorläuferprotein synthetisierte C-terminale

Verlängerung mittels Atg4 entfernt (Klionsky und Schulman 2014, Wen und Klionsky 2016). Anschließend wird Atg8 durch das E1-Enzym Atg7 aktiviert und an das E2-Enzym Atg3 überführt (Klionsky und Schulman 2014, Wen und Klionsky 2016). Dieses ligiert zusammen mit dem Atg12-Atg5-Atg16 E3-Enzymkomplex Atg8 mit PE zu Atg8-PE (Feng *et al.* 2014, Klionsky und Schulman 2014, Wen und Klionsky 2016). Die Dekonjugation von Atg8-PE erfolgt durch die Spaltung mittels Atg4 (Kaufmann *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Auf Grund der Tatsache, dass Atg8 sowohl an der PAS, an der Isolationsmembran und am Autophagosom lokalisiert ist, wird das Protein als Marker für den autophagischen Prozess eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.2) (Suzuki *et al.* 2013). Die Verlängerung, aber auch die Biegung der Phagophorenmembran wird durch das Atg12-Atg5-Atg16-Konjugationssystem vorangetrieben (Zappavigna *et al.* 2013). Hierbei wird Atg12 kovalent an Atg5 mit Hilfe von Atg7 und Atg10 (E2-Enzym) gebunden (Klionsky und Schulman 2014, Wen und Klionsky 2016). Nach erfolgreicher Konjugation wird Atg5 mit Atg16 verknüpft (Klionsky und Schulman 2014, Wen und Klionsky 2016). Der Atg12-Atg5-Atg16-Komplex ist mit Atg8-PE in einem Membrangerüst assoziiert (Kaufmann *et al.* 2014). Das Recyclen von Atg8-PE mittels Atg4 löst die Disassemblierung des Gerüstproteins aus (Kaufmann *et al.* 2014). Das PI3P-Protein Atg21 kann mit Atg8 und Atg16 (nicht mit Atg5 oder Atg12) interagieren und fördert gleichzeitig die Rekrutierung von Atg8 zur PAS (Juris *et al.* 2015).

Das geschlossene Vesikel, das Autophagosom, fusioniert im vierten Schritt der Autophagie mit der Vakuole bzw. mit dem Lysosom (siehe Abschnitt 1.4.4) (Zappavigna *et al.* 2013, Wen und Klionsky 2016). Die im Autophagosom enthaltenen Proteine und Organellen werden in der letzten Autophagiestufe durch verschiedene Hydrolasen, wie die Lipase Atg15 abgebaut. Die Spaltprodukte (Lipide, Kohlenhydrate, Aminosäuren) werden anschließend ins Zytosol abgegeben (Klionsky und Schulman 2014, Wen und Klionsky 2016).

#### 1.4.2.4 Physiologische Rolle der Autophagie

Die Spaltprodukte des autophagischen Prozesses dienen den Zellen und Axonen zur Aufrechterhaltung ihrer Protein- und Organellenhomöostase (Wang *et al.* 2010, Yang *et al.* 2013, Feng *et al.* 2014, Klionsky und Schulman 2014, Wong und Holzbaur 2015, Huber und Teis 2016, Wen und Klionsky 2016). So können z. B. die gewonnenen Aminosäuren einerseits für die Synthese von neuen Proteinen verwendet oder andererseits mit Hilfe des Citratzyklus in Energie umgewandelt werden (Boya *et al.* 2013, Yang *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013). Somit ist es den Zellen möglich, Hungerphasen zu überdauern (Boya *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013). Die Eliminierung überflüssiger Organellen ermöglicht zudem die

Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und wird zur Zelldifferenzierung und Entwicklung genutzt (Klionsky 2007, Wang *et al.* 2010, Boya *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013, Klionsky und Schulman 2014). So wird die selektive Autophagie während der Erythropoese zur Entfernung der Mitochondrien aus den roten Blutkörperchen und bei der Umstellung von Ölsäure-haltigem Medium auf Glukosemedium zum Abbau der Peroxisomen in der Hefe benötigt (Bryant und Stevens 1998, Fader und Colombo 2006, Klionsky und Schulman 2014). Des Weiteren deutet vieles darauf hin, dass die Autophagie eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krebs spielt (Klionsky 2007, Boya *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass Beclin-1 (humanes Homolog zu Atg6 der Hefe) als Tumorsuppressor dient. Die Deletion des Proteins auf einem Allel wurde zudem bei verschiedenen Krebsarten entdeckt (Wong und Cuervo 2010, Zappavigna *et al.* 2013). Die Autophagie ist eine weitere Möglichkeit, neben der Nekrose und der Apoptose, den Zelltod zu initiieren (Klionsky 2007, Zappavigna *et al.* 2013.) Auch bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort ist der autophagische Mechanismus von großer Bedeutung (Klionsky 2007, Boya *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013). So werden mit Hilfe der Autophagie invasive Mikroorganismen und Viren innerhalb der Zelle eliminiert (Klionsky 2007, Zappavigna *et al.* 2013). Bei der Autophagie handelt es sich um einen primär protektiven Selbstverteidigungsmechanismus, der durch den Abbau von potenziell toxischen Proteinen und defekten Organellen die Zellschädigung und den Zelltod unterbindet. Die Aktivierung der Autophagie führt zu einer Reduktion der Toxizität von verschiedenen aggregationsgeneigten UPS-resistenten Proteinen, wie z. B. Huntingtin oder SOD1 und verhindert somit die Entstehung von Proteinopathien und neurodegenerativen Erkrankungen (Klionsky 2007, Wang *et al.* 2010, Boya *et al.* 2013, Yang *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013, Wong und Holzbaur 2015). In diesem Zusammenhang wurde die Autophagie als effektiver Mechanismus zur Eliminierung des neurotoxischen Proteins TDP-43 vorgeschlagen (Wang *et al.* 2012, Belzil *et al.* 2013, Barmada *et al.* 2014, Scotter *et al.* 2014, Wong und Holzbaur 2015).

#### 1.4.2.5 Pathophysiologische Rolle der Autophagie

Ist die zelluläre Schädigung zu groß, die Apoptose oder der autophagische Prozess beeinträchtigt oder zu exzessiv, kann dies zur Alterung und zum Tod der Zelle beitragen (Klionsky 2007). Auch im Hinblick auf Krebs wurde ein autophagisches Ungleichgewicht festgestellt (Wen und Klionsky 2016). In den Krebszellen tritt bei einer Abnahme der Angiogenese (Blutgefäßbildung) verstärkt metabolischer Stress in Form von Nährstoffmangel

und Hypoxie auf. Die Autophagie ermöglicht, durch die Reduktion von oxidativem Stress und der Aufrechterhaltung der genomischen DNA, das Überleben und die Metastasierung der Tumorzellen (Boya *et al.* 2013, Zappavigna *et al.* 2013). Eine uneffektive oder maßlose Autophagie führt darüber hinaus zur lokalen Akkumulation von Autophagosomen in den Neuronen, zur Störung in der Proteinhomöostase, zur Aggregation von Proteinen, zur Dystrophie der Neuriten und zur neuronalen Degeneration (Wong und Cuervo 2010, Yang *et al.* 2013, Wong und Holzbaur 2015). Eine intensive Induktion der Autophagie mittels Rapamycinzugabe forciert die neuronale Degeneration und verkürzt die Lebensspanne in ALS-Mäusen (Yang *et al.* 2013). Im Einzelnen kann eine starke Mitophagie zur Verkürzung der Dendriten beitragen und der autophagische Prozess generell akuten und chronischen Stress induzieren (Yang *et al.* 2013). Infolgedessen werden die Schädigung und die Degeneration der Neuriten vorangetrieben (Yang *et al.* 2013). Diese pathologischen Merkmale können u. a. in Patienten mit einer Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung gefunden werden (Yang *et al.* 2013).

#### 1.4.2.6 Zusammenhang der Autophagie mit anderen proteolytischen Mechanismen

Die Autophagie steht physiologisch sowohl mit dem UPS als auch mit dem endosomal-vakuolären Proteinabbau in Verbindung. So spielt die Autophagie eine kompensatorische Rolle bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Proteinabbaus während einer reduzierten UPS-Aktivität (Wong und Cuervo 2010, Dantuma und Bott 2014). Auch beeinträchtigt eine chemische Hemmung der Autophagie das UPS (Dantuma und Bott 2014). Es kann daher vermutet werden, dass der autophagische Prozess für ein zügiges UPS notwendig ist und diesem bei der Entfernung von aggregierten oder geschädigten Proteinen assistiert (Wong und Cuervo 2010, Dantuma und Bott 2014). In der Zelle existieren ferner multifunktionelle Proteine, die sowohl bei der Autophagie als auch beim proteasomalen Abbau verwendet werden. Beispiele hierfür sind Ubiquilin sowie p62 (Wong und Cuervo 2010, Lee *et al.* 2011A, Ajroud-Driss und Siddique 2015, Dantuma und Bott 2014).

Eine funktionelle Verknüpfung der vakuolären Abbauewege beruht zum einen darauf, dass frühe oder späte Endosomen (auch bekannt als MVBs, *MultiVesicular Bodies*) als Membranquelle für Autophagosomen dienen könnten (Huber und Teis 2016). Überdies teilen sich die drei Kompartimente einige zelluläre Komponenten, wie PI(3)P, PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), Rab5 und Rab7 (Huber und Teis 2016). Ferner reguliert der TORC1 sowohl die Autophagie als auch die Endozytose (Huber und Teis 2016). Zahlreiche Studien bewiesen, dass die ESCRT-Maschinerie (*Endosomal Sorting Complex*

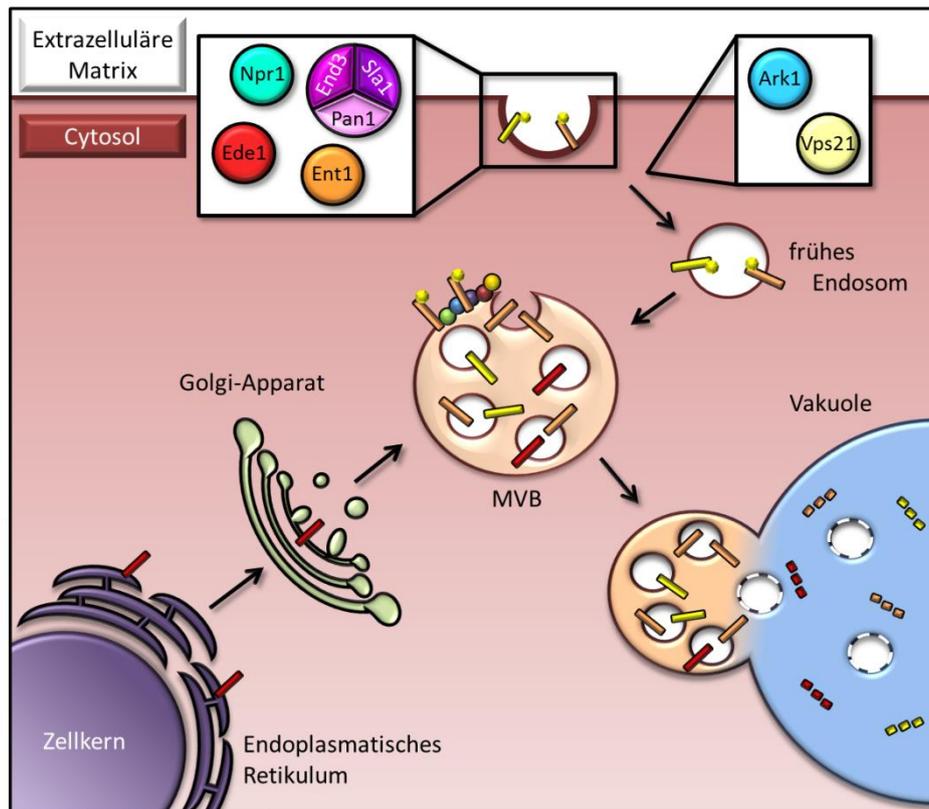
*Required for Transport*) für die Vollendung der Autophagie benötigt wird (Filimonenko *et al.* 2007, Lee *et al.* 2007, Rusten *et al.* 2007, Rusten und Stenmark 2009, Baixauli *et al.* 2014, Oshima *et al.* 2016). So führt die Deletion, die Herabregulation oder die Expression von mutierten ESCRT-Komponenten zur Anreicherung von Autophagosomen und zur Aggregation von Rab7-, p62- und Ubiquitin-positiven Proteinen (Filimonenko *et al.* 2007, Lee *et al.* 2007, Rusten *et al.* 2007, Lee *et al.* 2009, Oshima *et al.* 2016). Die Aufrechterhaltung des Aminosäurelevels in hungernden Zellen ist sowohl von der Autophagie als auch vom MVB-Weg abhängig (Müller *et al.* 2015). Im Übrigen gehen die Autoren davon aus, dass der endosomal-vakuoläre Prozess Plasmaproteine zur Verfügung stellt, die in der Vakuole zu Aminosäuren abgebaut und speziell zur Neusynthese von Autophagieproteinen verwendet werden (Müller *et al.* 2015). Auch sind die vakuolären Hydrolasen, deren Transport und Aufbau durch den MVB-Weg unterstützt werden, in der Autophagie unerlässlich (Müller *et al.* 2015). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das mit der MVB-Biogenese assoziierte humane Protein Alix (Hefehomologe sind Bro1 und Rim20) mit der autophagischen Kernmaschinerie interagiert (Murrow *et al.* 2015, Huber und Teis 2016). Darüber hinaus konnten Murrow und Mitarbeiter (2015) beweisen, dass eine gestörte Atg12-Atg3-Konjugation zu einer Akkumulation von peri-nukleären MVBs beiträgt und deren Transport zu den Lysosomen reduziert. Auch ist in höheren Eukaryoten bekannt, dass die Autophagosomen und die MVBs vor der Verschmelzung mit dem Lysosom fusionieren können (Rusten *et al.* 2007, Wong und Cuervo 2010, Baixauli *et al.* 2014, Huber und Teis 2016). Diese sogenannten Amphisome konnten allerdings bis heute in der Hefe nicht nachgewiesen werden (Klionsky 2005, Rusten *et al.* 2007, Demirezen *et al.* 2012, Manil-Segalén *et al.* 2012, Dengjel und Abeliovich 2017).

Zwei weitere potenzielle Schlüsselkomponenten im proteolytischen Abbau sind die AAA-ATPase Cdc48 (VCP im Menschen) und die E3-Ligase Rsp5 (Nedd4 im Menschen) (Braun 2015). Beide Enzyme werden sowohl im UPS, in der Autophagie und im endosomal-vakuolären Abbauweg benötigt (Braun 2015). Beim letztgenannten wird Rsp5 zur Markierung der Plasmamembranproteine verwendet.

### 1.4.3 Der endosomal-vakuoläre Abbauweg

#### 1.4.3.1 Überblick und Definition

Die Entfernung von Plasmamembranproteinen erfolgt in der Zelle über den endosomal-vakuolären Abbauweg (Schreij *et al.* 2016). Dieser kann in die frühe Endozytose und in den MVB-Weg untergliedert werden (Abb. 6) (Finley *et al.* 2012).



**Abb. 6: Schritte des endosomal-vakuolären Abbauwegs.** Im ersten Abschnitt, der frühen Endozytose, erfolgt die Aufnahme von extrazellulärem Material und Plasmamembranbestandteilen durch die Einstülpung der Zelloberfläche. Dieser Prozess benötigt eine Vielzahl an Proteinen. Das abgeschnürte Vesikel wird als frühes Endosom bezeichnet. Dieses kann zum späten Endosom, dem MVB, heranreifen. Im zweiten Abschnitt des endosomal-vakuolären Abbauwegs, dem MVB-Weg, erfolgt die Sortierung der ubiquitinierten Proteinladung mittels der ESCRT-Maschinerie. Anschließend fusioniert das MVB mit der Vakuole und die enthaltene Proteinladung wird dort abgebaut. Weitere Einzelheiten sind im Text erläutert.

Die Endozytose ist ein hoch konservierter, essentieller, konstitutiver oder Liganden-abhängiger Zellprozess (Bryant und Stevens 1998, Dupré *et al.* 2004, Toret und Drubin 2006, Weinberg und Drubin 2012, Lu *et al.* 2016). Es beschreibt die Aufnahme von extrazellulärem Material und Bestandteilen der Plasmamembran durch die Einstülpung der Oberfläche ins Zellinnere (Riezman *et al.* 1996, Bryant und Stevens 1998, Wendland *et al.* 1998, Baixauli *et al.* 2014, Huber und Teis 2016, Lu *et al.* 2016). Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist die Haupteintrittsrute für Nährstoffe, Wachstumsfaktoren, Signalrezeptoren, Ionenkanäle, Transporter, Zelladhäsionsmoleküle, Lipide und mehrere Pathogene (z. B. Influenza-A und Listerien), die den Weg okkupieren, um in die Zelle zu gelangen (Finley *et al.* 2012, Schreij *et al.* 2016, Huber und Teis 2016, Lu *et al.* 2016). Die Materialaufnahme erfolgt durch die Deformierung der Plasmamembran mittels eines zweidimensionalen Proteingitters, bestehend aus dem Hüllenprotein Clathrin und ca. 60 weiteren assoziierten Proteinen (Toret und Drubin 2006, Williams und Urbé 2007, Weinberg und Drubin 2012, Lu *et al.* 2016). Die Endozytose

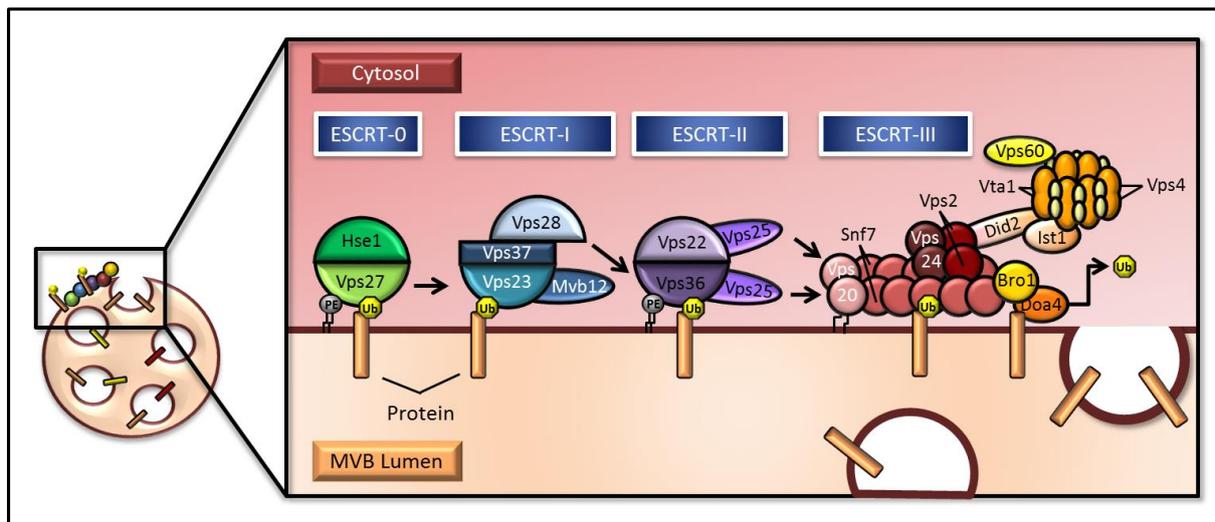
kann in der Hefe, im Gegensatz zum höheren Eukaryoten, auch unabhängig von Clathrin erfolgen. Hierbei werden  $\alpha$ -Arrestin-regulierende Rezeptoren zur Einstülpung verwendet (Toret und Drubin 2006, Weinberg und Drubin 2012, Lu *et al.* 2016). Wichtig dafür ist der Einsatz von Ubiquitin. Es wird in mehreren Schritten des endosomal-vakuolären Abbauwegs benötigt. Es dient als Initiierungssignal für die Plasmaproteine (z. B. Ste2 und Ste3), indem frühe Schichtproteine die Ubiquitinierung der zytosolischen Domäne erkennen und die Endozytose einleiten (Riezman *et al.* 1996, Katzmann *et al.* 2002, Weinberg und Drubin 2012, Finley *et al.* 2012, Lu *et al.* 2016). Die Markierung der Proteine kann mittels Rsp5 erfolgen (Wendland *et al.* 1998, Dupré *et al.* 2004, Finley *et al.* 2012, Weinberg und Drubin 2012, Lu *et al.* 2016). Der Eintritt in den MVB-Weg ist ebenfalls Ubiquitin-abhängig (Williams und Urbé 2007). So werden ausschließlich die ubiquitinierten Proteine von den ESCRTs (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) erkannt und der Vakuole zum Abbau zugeführt, alle anderen Proteine werden zurück zur Plasmamembran oder zum Golgi transportiert (Williams und Urbé 2007, Huber und Teis 2016).

#### 1.4.3.2 Molekulare Mechanismen des endosomal-vakuolären Abbauwegs

Im ersten Schritt des endosomal-vakuolären Abbaus können die Proteine je nach ihrer Ankunft am endosomalen Entstehungsort oder nach deren Funktion unterschieden werden. So existieren frühe Proteine (z. B. Ede1), frühe, mittlere und späte Umhüllungsproteine (Clathrin, AP-2 Komplex, Ent1, End3, Sla1, Pan1 u. a.), Las17, Las17-interagierende Proteine und Myosine (z. B. Vrp1, Bzz1, Myo3 und Myo5), Aktin und Aktin-assoziierte Proteine (z. B. Ark1, Arp2/3 Komplex, Abp1 u. a.) sowie teilungsrelevante Proteine (Rvs161 und Rvs167) (Toret und Drubin 2006, Weinberg und Drubin 2012, Lu *et al.* 2016). Im finalen Schritt schnürt sich das Protein-umhüllte Vesikel von der Zellmembran ab, trennt sich von der endosomalen Schicht und fusioniert mit einem frühen Endosom (Toret und Drubin 2006, Weinberg und Drubin 2012, Lu *et al.* 2016). Für das Andocken und die Fusion der unverhüllten Vesikel wird die aktive GTPase Vps21 (humanes Homolog ist Rab5) benötigt (Schreij *et al.* 2016). Das frühe Endosom hat für die Ladungsproteine drei Hauptziele: Recycling zur Plasmamembran, retrograder Transport zum *trans*-Golgi-Netzwerk und Abbau in der Vakuole (Katzmann *et al.* 2002, Schreij *et al.* 2016). Die frühe Endozytose stellt daher ein Hauptknotenpunkt und die erste Sortierungsstation im endosomal-vakuolären Abbauweg dar (Williams und Urbé 2007, Schreij *et al.* 2016). Der Großteil der endosomalen Ladung wird zurück zur Plasmamembran transportiert und nur ein kleiner Prozentsatz verbleibt im frühen Endosom, das anschließend zum MVB reift und in der Vakuole abgebaut wird (Schreij

*et al.* 2016, Huber und Teis 2016). Typischerweise werden *housekeeping* Rezeptoren zurück zur Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat recycelt (Hurley und Hanson 2010). Andere Faktoren allerdings, wie die vakuolären Hydrolasen, werden zur Vakuole transportiert (Hurley und Hanson 2010). Das frühe Endosom unterscheidet sich sowohl morphologisch als auch biochemisch vom MVB. So zeichnen sich die frühen Vesikel durch eine überwiegend tubuläre Struktur sowie eine spezifische Lipid- und Proteinzusammensetzung (z. B. PI3P, Vps21) aus (Bryant und Stevens 1998, Katzmann *et al.* 2002, Williams und Urbé 2007). Während des Übergangs vom frühen Endosom zum MVB wird Vps21 durch Ypt7 (humanes Homolog ist Rab7) bzw. PI3P durch PI4,5P2 ersetzt (Bryant und Stevens 1998, Williams und Urbé 2007, Huber und Teis 2016). Ferner besitzen die MVBs ein kugeliges, multivesikuläres Erscheinungsbild, tragen spezifische Bindungskomplexe (HOPS, *HOmotypic fusion and Protein Sorting*) sowie definierte SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*, z. B. Vam7 und Vti1), die die Fusion mit der Vakuole unterstützen (Katzmann *et al.* 2002, Huber und Teis 2016). Die charakteristischen intraluminalen Vesikel (ILVs) werden durch die Einstülpung der Membran in das endosomale Kompartiment gebildet (Williams und Urbé 2007, Finley *et al.* 2012, Schreij *et al.* 2016). Die Vesikelformung und die Einlagerung der Proteine in diese erfolgt in einem mehrstufigen Sortierungsprozess mit Hilfe der ESCRTs (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) (Schmidt und Teis 2012, Schreij *et al.* 2016, Huber und Teis 2016). Die multimeren Proteinkomplexe wurden erstmal in Hefe beschrieben (Williams und Urbé 2007). Die Komplexe ESCRT-0, I und II rekrutieren bzw. konzentrieren die Proteine, während der ESCRT-III- und Vps4-Komplex sie deubiquitiniert und in die modulierten ILVs separiert (Finley *et al.* 2012, Huber und Teis 2016). Die ubiquitinierte und damit zum Abbau bestimmte Proteinladung aus der frühen Endozytose und die biosynthetischen Komponenten vom *trans*-Golgi-Apparat (z. B. neusynthetisierte Hydrolasen) werden zunächst vom ESCRT-0-Komplex erkannt (Abb. 7) (Schmidt und Teis 2012, Balderhaar und Ungermann 2013, Schreij *et al.* 2016, Huber und Teis 2016).

ESCRT-0 ist ein Heterodimer bestehend aus Vps27 und Hse1 (Williams und Urbé 2007, Schmidt und Teis 2012). Der Komplex ist mittels PI3P in die MVB-Membran verankert und enthält insgesamt fünf Ubiquitinbindungsdomänen, die die Interaktion mit den Ubiquitinmarkierten Substratproteinen ermöglichen (Schmidt und Teis 2012). Vps27 kann an die ESCRT-I-Untereinheit Vps23 binden (Williams und Urbé 2007, Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Der ESCRT-I-Komplex ist ein lösliches Heterotetramer und setzt



**Abb. 7: Überblick zur ESCRT-Maschinerie.** Die zum Abbau bestimmte, ubiquitinierte Proteinladung wird von einem ESCRT-Komplex zum nächsten weitergereicht, um anschließend in ein intraluminales Vesikel (ILV) eingeschlossen zu werden. Die Ubiquitinabspaltung erfolgt vor der Aufnahme des Substrats in ein ILV und wird durch die Deubiquitinase Doa4 initiiert. Die AAA-ATPase Vps4 unterstützt nachfolgend die Disassemblierung der ESCRT-Komplexe. Die Pfeile deuten die Interaktionspartner zwischen den Komplexen an. Ub steht für Ubiquitin und PE für Phosphatidylinositol-3-Phosphat. Weitere Einzelheiten und Abkürzungen sind im Text erläutert.

sich aus Vps23, Vps28, Vps37 und Mvb12 zusammen (Williams und Urbé 2007, Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Sowohl Vps23 als auch Mvb12 binden ubiquitinierte Proteine (Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Vps28 steht mit Vps36, einer ESCRT-II-Untereinheit, in Kontakt (Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Die weiteren Bestandteile des ESCRT-II-Komplexes sind Vps22 und zwei Vps25 Moleküle (Williams und Urbé 2007, Hurley und Hanson 2010 Schmidt und Teis 2012). Vps22 und Vps36 interagieren miteinander und jeweils ein Vps25 ist an eines dieser Proteine gebunden (Schmidt und Teis 2012). Hierdurch entsteht eine charakteristische Y-Struktur (Schmidt und Teis 2012). Vps36 steht über PI3P mit der Endosomenmembran und über eine Ubiquitinbindungsstelle mit den Ladungsproteinen in Verbindung (Schmidt und Teis 2012). Die Komplexe ESCRT-I und II stabilisieren bei der Deformierung der Membran den Knospenhals und induzieren die Knospenbildung (Hurley und Hanson 2010). Die ESCRT-II-Untereinheit Vps25 bindet, rekrutiert und aktiviert Vps20 des ESCRT-III-Komplexes (Williams und Urbé 2007, Hurley und Hanson 2010). Das letzte ESCRT ist nur zeitweise an der MVB-Membran gebunden und katalysiert die Trennung des Knospenhalses von der Endosomenmembran (Hurley und Hanson 2010). Der Komplex besteht aus den vier Kernkomponenten Vps20, Snf7, Vps24 und Vps2 sowie aus den drei peripheren Untereinheiten Ist1, Did2 und Vps60 (Williams und Urbé 2007, Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Die Hauptsegmente enthalten Strukturen zur Membranbindung und

Dimerisierung (Schmidt und Teis 2012). So bindet Vps20 zuerst an Vps25 und aktiviert danach schrittweise die Homooligomerisation von Snf7 (Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Vps2 wird durch Vps24 zur Membran rekrutiert, beendet die Assemblierung des ESCRT-III-Filaments und begrenzt dadurch dessen Größe (Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Die peripheren Komponenten kommen später hinzu und spielen eine zentrale Rolle bei der regulierten Komplexauflösung (Hurley und Hanson 2010). Für den Abbau des ESCRT-III-Komplexes wird die AAA-ATPase Vps4 benötigt (Williams und Urbé 2007, Lee *et al.* 2009, Fontana *et al.* 2015). Diese liegt inaktiv als Mono- oder Dimer im Zytosol vor und wird durch die Rekrutierung zur MVB-Oberfläche aktiviert und an ESCRT-III gebunden (Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Die Einbeziehung des Enzyms erfolgt mit Hilfe der Proteine Vps2, Did2, Ist1 und Vps60 (Schmidt und Teis 2012). Die aktive Vps4-Form zeichnet sich durch zwei übereinander angeordnete hexamere Ringe aus, an denen zusätzlich Vti1-Dimere binden (Williams und Urbé 2007, Schmidt und Teis 2012). Diese Assemblierung steigert die ATPase-Aktivität (Williams und Urbé 2007, Schmidt und Teis 2012). Der geformte Zylinder enthält eine hydrophobe Pore, durch die möglicherweise das ESCRT-III-Polymer gezogen und dessen Monomere ins Zytosol entlassen werden (Hurley und Hanson 2010). Die Vps4-Aktivität wird durch Did2 positiv und durch Ist1 negativ reguliert (Hurley und Hanson 2010). Die Disassemblierung des ESCRT-III-Komplexes, mit Hilfe des Vps4-Komplexes, benötigt Energie in Form von ATP (Hurley und Hanson 2010, Schmidt und Teis 2012). Die Deubiquitinierung der Proteinladung erfolgt, bevor diese in ein intraluminales Vesikel (ILV) aufgenommen wird (Williams und Urbé 2007). Die Deubiquitinase (DUB) Doa4 wird durch Bro1 zur MVB-Membran rekrutiert und sichert durch seine Enzymaktivität ein konstantes Level an freiem Ubiquitin (Williams und Urbé 2007, Finley *et al.* 2012, Schmidt und Teis 2012). Ist die Fracht im MVB verpackt, kann das Vesikel durch einen retrograden Transport die Ladung zurück ins Golgi recyceln oder es fusioniert mit der Plasmamembran und entlässt seine ILVs als Exosomen in die extrazelluläre Umwelt (Baixauli *et al.* 2014, Schreij *et al.* 2016). Eine weitere Möglichkeit ist die Verschmelzung des MVBs mit der Vakuole und dem Abbau der Proteinladung.

#### 1.4.3.3 Funktionen des endosomal-vakuolären Abbauwegs

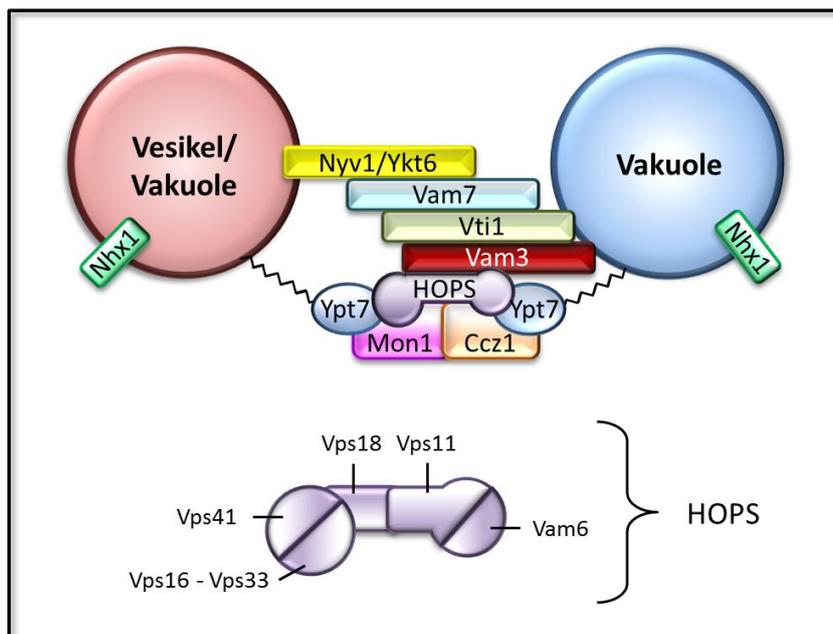
Die Funktionen des endosomal-vakuolären Wegs sind vielfältig. So ist er im Allgemeinen für die normale Funktion und das Überleben der eukaryotischen Zelle notwendig (Schreij *et al.* 2016). Im Speziellen wird er im humanen System für die Reifung der Retikulozyten, die Cytokinese, die Antigenpräsentation, die Wiederverwertung von synaptischen Molekülen, die

Dendritenintegrität sowie den Erhalt der Neuronen benötigt (Katzmann *et al.* 2002, Dupré *et al.* 2004, Fader und Colombo 2006, Lee *et al.* 2007, Saksena und Emr 2009). Ferner werden eine Fülle von Transportern und Rezeptoren der Plasmamembran über den endosomal-vakuolären Weg abgebaut, sodass zum einen die Signalübertragung moduliert und zum anderen die zelluläre Homöostase aufrechterhalten wird (Katzmann *et al.* 2002, Dupré *et al.* 2004, Saksena und Emr 2009, Finley *et al.* 2012, Schmidt und Teis 2012, Müller *et al.* 2015). Nicht zuletzt werden über diesen Weg fehlgefaltete bzw. aggregierte Proteine abgebaut. Somit ist er Teil der Proteinqualitätskontrollmaschinerie und schützt vor Zytotoxizität und Neurodegeneration (Wang *et al.* 2011, Baixauli *et al.* 2014, Braun 2015, Oshima *et al.* 2016). Eine Störung im endosomal-vakuolären Abbauweg spiegelt sich in der Entstehung von Tumoren, Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen wider. So führt eine fehlerhafte Cytokinese zur Bildung von multinukleären Zellen und zur Entwicklung von Aneuploidien (Genommutationen, bei der einzelne Chromosomen fehlen oder überzählig vorliegen) und bösartigen Tumoren (Saksena und Emr 2009). Des Weiteren kann eine mangelnde Regulation der Zellmembranrezeptoren Krebs, Diabetes oder kardiovaskulären Erkrankungen verursachen (Saksena und Emr 2009, Schmidt und Teis 2012). Der eingeschränkte Transport von vakuolären bzw. lysosomalen Hydrolasen bedingt eine eingeschränkte Aktivität des Organells und führt zur Akkumulation von nichtabgebauten, möglicherweise toxischen Makromolekülen (Schreij *et al.* 2016). Nachgewiesenermaßen sind Neuronen besonders anfällig für lysosomale Fehlfunktionen (Schreij *et al.* 2016). So konnte ein abnormaler endosomal-vakuolärer Abbauweg mit mehreren neurodegenerativen Krankheiten, wie ALS oder FTD in Zusammenhang gebracht werden (Skibinski *et al.* 2005, Parkinson *et al.* 2006, Filimonenko *et al.* 2007, Saksena und Emr 2009, Urwin *et al.* 2010, Schmidt und Teis 2012). Die Fusion des endosomalen Vesikels und des Autophagosoms mit der Vakuole ist eine weitere, bisher noch nicht erläuterte Gemeinsamkeit beider proteolytischer Abbauwege.

#### 1.4.4 Die Vakuolenfusion – das Bindeglied zwischen Autophagie und endosomalem Abbau

Die Autophagie und der endosomal-vakuoläre Weg benötigen dieselbe Fusionsmaschinerie, bestehend aus den Rab/Ypt GTPasen, deren interagierende Effektoren sowie SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*) (Abb. 8) (Klionsky 2005, Rusten *et al.* 2007, Balderhaar und Ungermann 2013, Auffarth *et al.* 2014, Huber und Teis 2016). Die Rab-Proteine im humanen System bzw. die Ypt-Proteine in der Hefe können in einer inaktiven GDP oder in einer aktiven GTP Form vorliegen (Balderhaar und

Ungermann 2013). Sie dienen somit als Organellen-spezifische „Schalter“, die durch GEFs (Guaninnukleotid-Austauschfaktor) und GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) reguliert werden können (Wickner 2002, Balderhaar und Ungermann 2013, Auffarth *et al.* 2014). Die aktiven Rabs/Ypts können verschiedene Effektoren binden, wodurch das Andocken der Proteine an die Membran ermöglicht wird (Wickner 2002). Der frühe Endosomenmarker Vps21 kann mit den Effektoren Vac1, Vps34, Vps3 und Vps8 interagieren, um die Fusion von endozytotischen oder Golgi-abgeleiteten Vesikeln mit den frühen Endosomen zu initiieren (Balderhaar und Ungermann 2013). Während der Reifung wird Vps21 durch Ypt7 ersetzt, welches anschließend die Verschmelzung der MVBs mit der Vakuole reguliert (Balderhaar und Ungermann 2013). Der Mon1-Ccz1-Komplex unterstützt als GEF von Ypt7 die Aktivierung der GTPase (Balderhaar und Ungermann 2013, Auffarth *et al.* 2014). Das aktivierte Ypt7 Protein, welches sowohl in der Vesikelmembran, als auch in der Vakuole lokalisiert ist, interagiert im Fusionsprozess mit den hexameren Anbindungskomplexen



**Abb 8: Die Fusionsmaschinerie.** Für die Fusion zweier Kompartimente, wie etwa dem autophagischen oder dem endosomalen Vesikel mit der Vakuole werden die GTPase Ypt7, der Effektor-komplex HOPS und spezielle t- und v-SNAREs benötigt. Ferner unterstützen Nhx1 und der Mon1-Ccz1-Komplex die Verbindung.

CORVET (*class C core Vacuole/Endosome Tethering*) oder HOPS (*HOmotypic fusion and Protein Sorting*) (Wickner 2002, Balderhaar und Ungermann 2013, Auffarth *et al.* 2014). Während der CORVET-Komplex die Fusion von Endosom mit Endosom (frühe homotypische Fusion) vermittelt, wird HOPS für die Verschmelzung der Vakuole mit der Vakuole (homotypische Fusion) sowie der MVBs, Autophagosomen und Golgi-abgeleiteten Vesikeln mit der Vakuole (heterotypische Fusion) benötigt (Balderhaar und Ungermann 2013). Der HOPS-Komplex setzt sich aus Vps11, Vps16, Vps18, Vps33, Vps39 (Vam6) und Vps41 zusammen (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008, Balderhaar und Ungermann 2013).

Die Untereinheiten Vps39 und Vps41 sind an beiden gegenüberliegenden Seiten des HOPS-Komplexes lokalisiert und binden Ypt7 sowie den Mon1-Ccz1 Komplex (Balderhaar und Ungermann 2013). Durch die Verbindung mit Ypt7 verknüpft HOPS die Membranen zweier Kompartimente (z. B. Autophagosom mit Vakuole) (Ostrowicz *et al.* 2008, Balderhaar und Ungermann 2013). Die Proteine Vps16 und Vps33 können mit SNAREs in Kontakt treten (Balderhaar und Ungermann 2013). Die Regulation des HOPS-Komplexes und somit der gesamten Fusion kann durch die Caseinkinase Yck3 erfolgen (Ostrowicz *et al.* 2008, Balderhaar und Ungermann 2013). Die konservierten SNARE-Proteine sind in den Membranen beider Fusionskompartimente lokalisiert (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Die SNAREs sind an drei Verschmelzungsereignissen beteiligt: an der Fusion von ER abgesonderten Vesikel mit dem Golgi-Apparat, an der homo- bzw. heterotypischen Vakuolenfusion und an der Verbindung von Vesikeln mit der Plasmamembran (McNew *et al.* 2000). Die SNAREs können in mehrere Formen und Klassen unterteilt werden. Beispielsweise verdeutlicht die *cis*-Form, dass das Protein nur in einer Membran befestigt ist (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Bei der *trans*-Form sind die SNAREs in beiden aneinander liegenden Membranen der andockenden Kompartimente verankert (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Die sogenannten t-SNARE (*Target membrane*) Proteine sind in der Zielmembran, wie z. B. in der Plasmamembran oder der Vakuole, lokalisiert (McNew *et al.* 2000, Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Vam3 (*V*acuolar *M*orphogenesis) ist ein t-SNARE-Protein, interagiert mit Vps18 und ist zugleich ein multispezifischer Rezeptor (Darsow *et al.* 1997, Bryant und Stevens 1998, Wickner 2002). Die v-SNAREs (*Vesikular*) bilden mit den t-SNAREs Paare und sind in einer heterotypischen Fusion im Vesikel bzw. in einer homotypischen Fusion in der Vakuole verankert (McNew *et al.* 2000, Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Bekannte v-SNARE-Proteine sind Nyv1 (bei der homotypischen Fusion benötigt) und Ykt6 (bei der heterotypischen Fusion benötigt) (McNew *et al.* 2000, Wickner 2002). Die SNAREs können durch die ATPase Sec18 und dessen Co-Chaperon Sec17 recycelt werden (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008).

Die homotypische bzw. heterotypische Fusion läuft identisch ab und wird generell in drei Schritte untergliedert (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008, Auffarth *et al.* 2014). Im ersten Schritt, der Vorbereitung oder *Priming*, werden die Vakuolen und Vesikel für den ersten Kontrakt und die anschließende Fusion präpariert (Ostrowicz *et al.* 2008). Hierbei unterstützt die durch Sec18 herbeigeführte ATP-Hydrolyse die Freisetzung von Sec17 aus der Vakuole und die Disassemblierung des *cis*-SNARE-Komplexes (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Während des Komplexabbaus löst sich Vam7, verbleibt allerdings als peripheres

Membranprotein an der Fusionsstelle (Wickner 2002). Nach der Demontage befinden sich die SNARE-Komplexe in einem aktiven, fusionskompetenten Zustand (Ostrowicz *et al.* 2008). Im selben Schritt aktiviert der HOPS-Komplex Ypt7 und bleibt als Effektor an der GTPase gebunden (Wickner 2002). In der nächsten Stufe erfolgt das Anbinden oder *Tethering* der Membranen. Diese reversible Reaktion benötigt aktiviertes Ypt7 und HOPS (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008). Der letzte Schritt, das Andocken (*Docking*) und die Fusion, wird durch Ypt7, HOPS und durch die Paarung von v- und t-SNAREs eingeleitet (Wickner 2002). Die zytoplasmatischen Domänen von Vam3, Vam7 und Vti1 bilden mit Nyv1 oder Ykt6 einen Komplex, der die beiden zu fusionierenden Membranen verbindet (Ostrowicz *et al.* 2008). Die Membranfusion kann u. a. durch  $\text{Ca}^{2+}$  und durch die Ansäuerung der Kompartimente (Nhx1 agiert hierbei als Ionenaustauscher) unterstützt werden (Wickner 2002).

Für die Erforschung der Vakuolenfusion ist die Hefe aus mehreren Gründen besonders gut geeignet. So steht ein simpler *in vitro* Fusionsassay zur Verfügung. Ferner kann die Vakuole schnell und leicht angefärbt oder isoliert werden (Wickner 2002, Ostrowicz *et al.* 2008).

Die Vakuole ist das zentrale Organell der Hefe für die Aufrechterhaltung der Physiologie (Bryant und Stevens 1998). Der saure pH-Wert im Inneren ist die Voraussetzung für die Funktionstätigkeit der vakuolären Hydrolasen (Ostrowicz *et al.* 2008). Enthält die Vakuole seinen kompletten Proteinbesatz, so können verschiedene zelluläre Aufgaben, wie die pH- und Osmoregulation, die Lagerung von Aminosäuren, kleinen Ionen und Phosphaten oder die Sporulation reibungslos erfolgen (Bryant und Stevens 1998). Ebenso werden fehlgefaltete oder aggregierte Proteine, die sonst die Zelle schädigen könnten, über die Vakuole eliminiert.

In der vorliegenden Arbeit sollen Gene für unterschiedliche Eliminierungs-relevante Organellen, wie die Vakuole und Wege, wie die Autophagie, identifiziert werden, die die TDP-43-bedingte Toxizität modifizieren. Ferner sollen die Auswirkungen der TDP-43-Expression auf die Vakuolenmorphologie, die proteolytischen Abbauwege und die Vakuolenfusion bestimmt werden. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wird der Effekt der TDP-43-Überexpression auf die Proteinzusammensetzung einer Hefezelle mittels eines quantitativen proteomischen Ansatzes (SILAC) untersucht.

## 2 Zielsetzung

### 2.1 Identifikation zellulärer Einflussfaktoren auf die TDP-43-bedingte Zytotoxizität

Die Beseitigung geschädigter oder überflüssiger Organellen sowie fehlgefalteter, potenziell toxischer Proteine ist für die Zelle ein überlebenswichtiger Prozess (Bjørkøy *et al.* 2005, Levine und Yuan 2005, Tai und Schuman 2008, Ciechanover und Kwon 2015, Franz *et al.* 2015, Opattova *et al.* 2015). Durch die Anreicherung von aggregierten Proteinen läuft die Zelle Gefahr irreparabel geschädigt zu werden und abzusterben. Speziell Neuronen sind auf Grund ihrer Physis anfällig für diese Art von Schädigung. Die Aufklärung der molekularen Prozesse, welche zur Proteinefehlfaltung und –aggregation sowie zum Absterben der Zelle führen, spielt eine zentrale Rolle in der humanen Forschung. So könnten der Entstehung von neurodegenerativer Erkrankungen vorgebeugt oder die Heilungschancen gefördert werden. Das neurotoxische Protein TDP-43 ist der bei ALS-Patienten am häufigsten in pathologischen Einschlüssen detektierte Bestandteil (Taylor *et al.* 2016).

Um die zytotoxische Auswirkung von TDP-43 auf eine eukaryotische Zelle zu untersuchen wurde der Modellorganismus *S. cerevisiae* verwendet. Die Expression eines humanen TDP-43-Konstrukts führt bei der Hefezelle zur Minderung des Wachstums. Dieses Defizit kann mit Hilfe eines Tüpfeltest nachgewiesen werden. Hierbei werden die Zellen, die entweder ein Kontrollplasmid bzw. ein TDP-43-Konstrukt enthalten, in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf eine Agarplatte getüpfelt und mehrere Tage inkubiert. Die TDP-43-bedingte Zytotoxizität ist auf Grund des verminderten Wachses gegenüber der Kontrolle erkennbar. Mit Hilfe eines groß angelegten Tüpfeltestscreens sollten die TDP-43-induzierten Wachstumsdefizite in Hefe-Deletionsstämmen systematisch bestimmt werden. Die ausgeschalteten Gene codieren für Komponenten der Proteinabbauwege sowie für Organellen-assoziierte Proteine. Ziel dieser Arbeit ist es die Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die die TDP-43-induzierte Zytotoxizität modulieren, d.h. sie abschwächen oder verstärken. Ausgehend von den Ergebnissen können Hypothesen aufgestellt werden, wie diese Proteinabbauwege oder Organellen-assoziierten Prozesse beim Abbau oder der Modulierung von zytotoxischem TDP-43 eine Rolle spielen könnten.

## 2.2 Bestimmung des Einflusses von TDP-43 auf die vakuoläre Morphologie

Ein typisches Merkmal der ALS-Pathologie ist die morphologische und funktionelle Veränderung bestimmter Organellen wie z. B. der Mitochondrien oder der Vakuole (Joyce *et al.* 2011, Jiang *et al.* 2015, Edens *et al.* 2016). Darüber hinaus konnte mittels des in dieser Arbeit durchgeführten Tüpfeltestscreens (siehe oben) Vakuolenfusionsproteine gefunden werden, durch deren Verlust die TDP-43-bedingte Zytotoxizität deutlich anstieg. Ferner ist die Vakuole ein zentraler Bestandteil bei der Eliminierung von Zellbestandteilen. Auf Grund dieser Tatsachen soll das Erscheinungsbild der Vakuole im Fokus dieser Arbeit stehen.

In mehreren fluoreszenzmikroskopischen Experimenten erfolgt unter Zuhilfenahme spezifischer Marker die Analyse der vakuolären Morphologie in der Gegenwart von TDP-43. Neben der Überexpression von wildtypischem TDP-43 werden mehrere ALS-assoziierte Varianten getestet. Hierbei soll geklärt werden, ob die möglicherweise pathogenen Effekte durch krankheitsassoziierte TDP-43-Varianten verstärkt werden.

Darüber hinaus werden die Auswirkungen von Propranolol, einer pharmakologischen Substanz, die die Vakuolenfragmentierung forciert (Sasser *et al.* 2012 (A)), auf TDP-43-exprimierenden Hefezellen untersucht. Analysiert wird der Einfluss von Propranolol auf die durch TDP-43-Expression veränderte Vakuolenmorphologie bzw. Zytotoxizität.

## 2.3 Bestimmung des Einflusses von TDP-43 auf verschiedene Proteinkontrollmechanismen

Die Präsenz von TDP-43 beeinflusst neben den Organellen nachweislich auch Proteine der Proteinqualitätskontrollmechanismen. So zeigten Bose *et al.* (2011), dass TDP-43 das mRNA-Level von Atg7 (beteiligt an der Autophagie) reguliert. Um mögliche Veränderungen in den vakuolären Proteinabbauwegen, speziell in der Autophagie, während der Expression von TDP-43 zu überprüfen, werden bereits etablierte biochemische Untersuchungsmethoden angepasst. Sowohl der GFP-Atg8-Prozessierungsassay (Shintani und Klionsky 2004), als auch der Atg8-Lipidierungsansatz (Xie *et al.* 2008) sollen dazu genutzt werden, um die Autophagierate in TDP-43-exprimierenden Zellen zu bestimmen. Mit Hilfe dieser Arbeit könnte der postulierte Einfluss von TDP-43 auf den autophagischen Prozess validiert und erhärtet werden.

Neben der Autophagie zählen die Endozytose und der MVB-Weg zu den vakuolären Proteinabbauwegen. Im TDP-43 Tüpfeltestscreen konnte nachgewiesen werden, dass die

Störung des MVB-Wegs die TDP-43-bedingte Zytotoxizität forciert. Mögliche pathophysiologische Veränderungen dieser Wege durch die Expression von TDP-43 sollen fluoreszenzmikroskopisch und biochemisch detektiert werden. Für die Bestimmung der Endozytose-Aktivität werden der Farbstoff Lucifer Yellow, der durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird, untersucht. Ferner wird der endozytotische Abbau des Fusionsproteins Ste3-GFP, ein Plasmamembranprotein, verfolgt. Zur Analyse des MVB-Wegs soll die vakuoläre Spaltung des MVB-Substrats Sna3-GFP bestimmt werden. Neben der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wird zudem die vakuoläre Prozessierung von Sna3-GFP zu GFP mittels der biochemischen Western Blot Methode ermittelt.

## 2.4 Analyse von TDP-43 als potenzielles Substrat vakuolärer Abbauwege

Die explizite Beteiligung der proteolytischen Abbauwege beim Eliminieren von TDP-43 aus der Zelle wird in der Fachwelt stark diskutiert. Eine Reihe wissenschaftlicher Abhandlungen beschreibt die komplexen Verflechtungen von Autophagie und UPS beim TDP-43-Abbau (Urushitani *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Huang *et al.* 2014, Scotter *et al.* 2014). Ferner konnte in dieser Arbeit mit Hilfe des Tüpfeltestscreens eine Verschlechterung im Wachstum bei Hefezellen mit gestörtem MVB-Weg oder vakuolärer Fusion bei der Expression von TDP-43 festgestellt werden. In Bezug auf die Beseitigung des neurotoxischen Proteins werden proteolytisch relevante Wege, wie die Autophagie, das UPS, der MVB-Weg und die vakuoläre Fusion in Hefe näher analysiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot sollen das TDP-43-Proteinlevel, die Anzahl der TDP-43-Aggregate und die Kolokalisation von TDP-43 mit Komponenten der Proteinabbauwege identifiziert werden. Zur Bestimmung dieser drei Faktoren werden Einfach- und Doppeldeletionsstämme verwendet. Die Doppeldeletionsstämme enthalten Genmutationen, die für Proteine aus zwei unterschiedlichen proteolytischen Mechanismen codierten. So ist bei  $\Delta vam3\Delta atg1$  sowohl die vakuoläre Fusion als auch die Autophagie gestört. Mit Hilfe der Einfach- und Doppeldeletionsstämme können die Auswirkungen der Proteinabbauwege allein oder in Kombination mit einem weiteren Mechanismus beim TDP-43-Eliminierungsprozess verfolgt werden. Ist eine TDP-43-Anreicherung bzw. Steigerung von TDP-43-Aggregaten nachweisbar, gibt dies einen Hinweis darauf, dass der betroffene Prozess beim Abbau des neurotoxischen Proteins eine Rolle spielt. Gleiches gilt bei einer Kolokalisation von TDP-43 mit einem Protein für einen proteolytischen Prozess. Eines dieser Proteine ist Rsp5. Die E3-Ligase, die u. a. an der

Ubiquitinierung mehrerer Plasmaproteine beteiligt ist (Morvan *et al.* 2004, Wang *et al.* 2011). Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein essentieller Schritt bei allen proteolytischen Abbaumechanismen. Interessanterweise besitzen viele ALS-Patienten und Modellorganismen ubiquitinierte TDP-43-Aggregate (Neumann *et al.* 2006, Wegorzewska *et al.* 2009, Igaz *et al.* 2009). Möglicherweise markiert Rsp5 auch TDP-43 für dessen Eliminierung. Eine starke Überlagerung beider Proteine spräche für eine unmittelbare Beteiligung von Rsp5 am TDP-43-Abbauprozess. Wird die Aktivität der Ubiquitinligase modifiziert, könnte dies auch Auswirkungen auf den TDP-43-Metabolismus haben. Diese Aussage wird mit Hilfe mehrerer Rsp5-Varianten untersucht. Die Mutanten variieren in ihrer Fähigkeit der Proteinubiquitinierung (Wijayanti *et al.* 2015). Weisen die Varianten unterschiedliche Level an TDP-43 auf oder variieren sie in ihrer TDP-43-Aggregatanzahl, könnte das ein Hinweis auf einen Rsp5-abhängigen TDP-43-Abbau sein.

## 2.5 Bestimmung des Einflusses von TDP-43 auf das Proteom von Hefezellen

TDP-43 als DNA- und RNA-bindendes Protein übernimmt essentielle Funktionen in der RNA-Homöostase. Polymenidou *et al.* (2011) konnten für TDP-43 mehr als 6000 Ziel-RNAs im murinen Gehirn identifizieren. Die Depletion von TDP-43 veränderte das Level von mehr als 600 mRNAs und beeinflusste mehr als 950 Spleißereignisse. Auf Grund der Funktion von TDP-43 auf die Transkription von Genen für die Autophagie und des UPS (Atg7 oder VCP) wirken sich Regulationsstörungen ebenso auf die Proteinebene aus (Bose *et al.* 2011; Polymenidou *et al.* 2011). Nicht nur die Depletion, sondern auch die Anreicherung von TDP-43 könnte einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese besitzen. Neben diesen direkten Effekten von TDP-43 auf die *steady-state level* einzelner Proteine, kann es auch Proteinveränderungen geben, die indirekt durch die Zytotoxizität von TDP-43 entstehen. Auch diese Veränderungen könnten wichtig für die Umsetzung oder Verhinderung der Zytotoxizität von TDP-43 sein.

Für die Identifizierung TDP-43-induzierter Veränderungen in der zellulären Proteinzusammensetzung wurde das neurotoxische Protein in Hefekulturen überexprimiert, Zellextrakte isoliert und diese anschließend massenspektrometrisch analysiert. Hierbei wird die quantitative proteomische Methode SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) angewandt. Die gewonnenen Erkenntnisse können zur Detektion von weiteren

TDP-43-Interaktoren dienen und möglicherweise Aufschluss über die Ursache verschiedener Krankheiten liefern.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Überblick über Hefestämme, Plasmide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Die selbst hergestellten haploiden Einfach- und Doppeldeletionsstämme entstanden aus der Paarung von BY4741 (MAT $\alpha$ ) und BY4742 (MAT $\alpha$ ) Einfachdeletionsstämmen mit anschließender Sporulation und Tetradendisektion und sind isogen zu den BY-Stämmen (siehe Abschnitt 3.5 und 3.6).

Die Plasmide und Primer, welche bei der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 2 bzw. 3 zusammengefasst. Die in der PCR (Polymerasekettenreaktion) verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA), Microsynth AG (Balgach, Schweiz) oder metabion international AG (Planegg, Deutschland) erworben.

**Tab.1: In dieser Arbeit verwendete Hefestämme.**

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
wt		BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Brachmann <i>et al.</i> 1998 Wijayanti <i>et al.</i> 2015
wt (für SILAC-Analysen)		BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta</math>arg4::kanMX4 <math>\Delta</math>lys2::URA3</i>	Büttner <i>et al.</i> 2013
wt		BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Brachmann <i>et al.</i> 1998, Dharmacon
wt		BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	diese Arbeit
Deletionsstämme - selektive und nichtselektive Autophagie				
$\Delta$ aim26	YKL037W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta</math>aim26::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta$ atg1	YGL180W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta</math>atg1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta$ atg1	YGL180W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta</math>atg1::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ atg2	YNL242W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta</math>atg2::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta atg3$	YNR007C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg3::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg5$	YPL149W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg5::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg6$	YPL120W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg6::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg7$	YHR171W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg7::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg8$	YBL078C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg8::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg9$	YDL149W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg9::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg10$	YLL042C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg10::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg11$	YPR049C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg11::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg12$	YBR217W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg12::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg13$	YPR185W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg13::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg14$	YBR128C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg14::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg15$	YCR068W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg15::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg15$	YCR068W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg15::kanMX4</math></i>	diese Arbeit
$\Delta atg16$	YMR159C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg16::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg17$	YLR423C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg17::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg18$	YFR021W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg18::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
<i>Δatg19</i>	YOL082W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg19::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg20</i>	YDL113C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg20::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg21</i>	YPL100W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg21::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg22</i>	YCL038C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg22::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg23</i>	YLR431C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg23::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg24</i>	YJL036W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg24::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg27</i>	YJL178C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg27::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg29</i>	YPL166W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg29::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg31</i>	YDR022C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg31::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg32</i>	YIL146C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg32::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg33</i>	YLR356W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg33::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg34</i>	YOL083W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg34::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg36</i>	YJL185C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg36::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δatg41</i>	YPL250C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δatg41::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δmdm10</i>	YAL010C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δmdm10::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δmdm12</i>	YOL009C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δmdm12::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta mdm34$	YGL219C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta mdm34::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta mmm1$	YLL006W	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta mmm1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pbs2$	YJL128C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pbs2::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pep4$	YPL154C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pep4::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pep4$	YPL154C		<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pep4::kanMX4</math></i>	diese Arbeit
$\Delta ptc6$	YCR079W	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ptc6::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta sir2$	YDL042C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta sir2::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta slg1$	YOR008C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta slg1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta slt2$	YHR030C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta slt2::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta snx4$	YJL036W	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta snx4::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta yil165c$	YIL165C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta yil165c::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<b>Mitochondrien-assoziierte Deletionsstämme</b>				
$\Delta cis1$	YLR346C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta cis1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta fmc1$	YIL098C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta fmc1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta gem1$	YAL048C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta gem1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta mdm38$	YOL027C	BY4742	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta mdm38::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
<i>Δmpc1</i>	YGL080W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δmpc1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δmpc2</i>	YHR162W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δmpc2::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δmpc3</i>	YGR243W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δmpc3::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δpor1</i>	YNL055C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δpor1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δpor2</i>	YIL114C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δpor2::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δuth1</i>	YKR042W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δuth1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<b>Deletionsstämme - retrograde Stressantwort</b>				
<i>Δbmh1</i>	YER177W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δbmh1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δbmh2</i>	YDR099W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δbmh2::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δcit2</i>	YCR005C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δcit2::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δdld3</i>	YEL071W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δdld3::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δrtg3</i>	YBL103C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δrtg3::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<b>Peroxisomen-assoziierte Deletionsstämme</b>				
<i>Δadr1</i>	YDR216W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δadr1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δoaf1</i>	YAL051W	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δoaf1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<i>Δpex3</i>	YDR329C	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 Δpex3::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta pex11$	YOL147C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pex11::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pex13$	YLR191W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pex13::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pex14$	YGL153W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pex14::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pex25$	YPL112C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pex25::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pex27$	YOR193W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pex27::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pip2$	YOR363C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta pip2::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta yll054c$	YLL054C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta yll054c::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<b>Deletionsstämme - Ubiquitin-Proteasom-System</b>				
$\Delta rpn4$	YDL020C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta rpn4::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta rpn4$	YDL020C		<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta rpn4::kanMX4</math></i>	diese Arbeit
$\Delta ubi4$	YLL039C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ubi4::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta ubi4$	YLL039C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ubi4::kanMX4</math></i>	diese Arbeit
<b>Deletionsstämme - Vakuolenfusion</b>				
$\Delta ccz1$	YBR131W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ccz1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta mon1$	YGL124C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta mon1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta nhx1$	YDR456W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta nhx1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vam3$	YOR106W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vam3::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta vam3$	YOR106W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vam3::kanMX4</math></i>	diese Arbeit
$\Delta vam6$	YDL077C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vam6::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vam7$	YGL212W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vam7::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps33$	YLR396C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps33::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps41$	YDR080W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps41::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta ybt1$	YLL048C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ybt1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta ypt7$	YML001W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ypt7::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
<b>Deletionsstämme - endosomal-vakuolärer Abbauweg</b>				
Vps2-GFP	YKL002W	BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <i>Vps2-GFP::HIS3MX4</i></i>	Huh <i>et al.</i> 2003
Vps27-GFP	YNR006W	BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <i>Vps27-GFP::HIS3MX4</i></i>	Huh <i>et al.</i> 2003
$\Delta ark1$	YNL020C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ark1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta doa4$	YDR069C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta doa4::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta ede1$	YBL047C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ede1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta end3$	YNL084C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta end3::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta ent1$	YDL161W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta ent1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta npr1$	YNL183C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta npr1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta sla1$	YBL007C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta sla1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta vps2$	YKL002W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps2::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps4$	YPR173C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps4::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps21$	YOR089C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps21::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps22$	YPL002C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps22::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps23$	YCL008C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps23::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps24$	YPL065W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps24::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps25$	YKL041W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps25::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps25$	YKL041W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps25::kanMX4</math></i>	M. Michalski, Universität Bayreuth, Deutschland
$\Delta vps27$	YNR006W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps27::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps27$	YNR006W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps27::kanMX4</math></i>	M. Michalski, Universität Bayreuth, Deutschland
$\Delta vps28$	YDR486C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps28::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vps60$	YJR102C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vps60::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta vta1$	YLR181C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta vta1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
Doppeldeletionsstämme				
$\Delta atg1$ $\Delta rpn4$	YGL180W YDL020C	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg1::kanMX4</math> <math>\Delta rpn4::kanMX4</math></i>	diese Arbeit
$\Delta atg1$ $\Delta ubi4$	YGL180W YLL039C		<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta atg1::kanMX4</math> <math>\Delta ubi4::kanMX4</math></i>	diese Arbeit

Standard-name	systematischer Genname	Stamm-hintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta vam3$ $\Delta atg1$	YOR106W YGL180W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δvam3::kanMX4 Δatg1::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta vam3$ $\Delta atg15$	YOR106W YCR068W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δvam3::kanMX4 Δatg15::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta vam3$ $\Delta pep4$	YOR106W YPL154C	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δvam3::kanMX4 Δpep4::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta vam3$ $\Delta vps24$	YOR106W YKL041W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δvam3::kanMX4 Δvps24::kanMX4</i>	M. Michalski, Universität Bayreuth, Deutschland
$\Delta vam3$ $\Delta vps25$	YOR106W YJR102C		<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δvam3::kanMX4 Δvps25::kanMX4</i>	M. Michalski, Universität Bayreuth, Deutschland
$\Delta vam3$ $\Delta vps27$	YOR106W YNR006W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δvam3::kanMX4 Δvps27::kanMX4</i>	M. Michalski, Universität Bayreuth, Deutschland
Weitere Deletionsstämme				
rsp5-A401E	YER125W	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>RSP5::rsp5-A401E</i>	Wijayanti <i>et al.</i> 2015
RSP5-P343S	YER125W	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>RSP5::RSP5-P343S</i>	Wijayanti <i>et al.</i> 2015
$\Delta acs1$	YAL054C	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δacs1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta atg26$	YLR189C	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δatg26::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta gat1$	YFL021W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δgat1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta hog1$	YLR113W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δhog1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta pho85$	YPL031C	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δpho85::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta spe1$	YKL184W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δspe1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta tco89$	YPL180W	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δtco89::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

Standard-name	systematischer Genname	Stammhintergrund	Genotyp	Referenz
$\Delta tor1$	YJR066W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta tor1::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta whi2$	YOR043W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta whi2::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon
$\Delta yor019w$	YOR019W	BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 <math>\Delta yor019w::kanMX4</math></i>	Giaever <i>et al.</i> 2002, Dharmacon

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.**

Plasmidname	Kopienanzahl	Auxotrophie-marker	Promotor	<i>E. coli</i> Resistenz	Referenz
pCM190	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>Dox TetOff</i>	<i>AmpR</i>	Gari <i>et al.</i> 1997
pCM190-TDP-43-wt	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>Dox TetOff</i>	<i>AmpR</i>	R. Braun, Universität Bayreuth, Deutschland
pUG35-EGFP	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>MET25</i>	<i>AmpR</i>	U. Güldener und J. Hegemann, Universität Düsseldorf, Deutschland
pUG35-TDP-43-wt-EGFP	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>MET25</i>	<i>AmpR</i>	R. Braun, Universität Bayreuth, Deutschland
pESC-HIS	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	<i>GAL10</i>	<i>AmpR</i>	Agilent Technologies
pESC-HIS-TDP-43-wt	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	<i>GAL10</i>	<i>AmpR</i>	Braun <i>et al.</i> 2011
pRS415-GFP-Atg8	<i>CEN6</i>	<i>LEU2</i>	<i>endogen</i>	<i>AmpR</i>	Böckler und Westermann 2014
pRS415-HA-Atg8	<i>CEN6</i>	<i>LEU2</i>	<i>endogen</i>	<i>AmpR</i>	S. Böckler, Universität Bayreuth, Deutschland
pRS316-Ste3-GFP	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>endogen</i>	<i>AmpR</i>	Wang <i>et al.</i> 2002
pRS416-Sna3-GFP	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>endogen</i>	<i>AmpR</i>	Wang <i>et al.</i> 2002

Plasmidname	Kopienanzahl	Auxotrophie-marker	Promotor	<i>E. coli</i> Resistenz	Referenz
ZM552	2 $\mu$	<i>LEU2</i>	<i>CMD1</i>	<i>AmpR</i>	DNASU Plasmid Repository, Arizona State University, USA
ZM552-VAM3	2 $\mu$	<i>LEU2</i>	<i>CMD1</i>	<i>AmpR</i>	DNASU Plasmid Repository, Arizona State University, USA
p416RFP-VAM3	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>endogen</i>	<i>AmpR</i>	Reggiori <i>et al.</i> 2005
pAD54-mRFP-VPS27	2 $\mu$	<i>LEU2</i>	<i>ADH1</i>	<i>AmpR</i>	Kanneganti <i>et al.</i> 2011
pAG413GAL-ccdB-DsRed	<i>CEN6</i>	<i>HIS3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR, CamR</i>	Alberti <i>et al.</i> 2007
pAG413GAL-TDP-43-wt-DsRed	<i>CEN6</i>	<i>HIS3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	H. Seebach, Universität Bayreuth, Deutschland
pAG423GAL-ccdB-DsRed	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR, CamR</i>	Alberti <i>et al.</i> 2007
pAG423GAL-TDP-43-wt-DsRed	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	R. Weinmann, Universität Bayreuth, Deutschland
pAG423GAL-ccdB-EGFP	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR, CamR</i>	Alberti <i>et al.</i> 2007
pAG423GAL-TDP-43-wt-EGFP	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	H. Seebach, Universität Bayreuth, Deutschland
pAG416GDP-EGFP-ccdB	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>GPD</i>	<i>AmpR, CamR</i>	Alberti <i>et al.</i> 2007
pAG416GDP-EGFP-Rsp5	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>GPD</i>	<i>AmpR</i>	M. Michalski, Universität Bayreuth, Deutschland
pAG416GAL-ccdB-DsRed	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR, CamR</i>	Alberti <i>et al.</i> 2007
pAG416GAL-TDP-43-DsRed	<i>CEN6</i>	<i>URA3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	H. Seebach, Universität Bayreuth, Deutschland
pAG426GAL-ccdB	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR, CamR</i>	Alberti <i>et al.</i> 2007

Plasmidname	Kopien- anzahl	Auxotrophie- marker	Promotor	<i>E. coli</i> Resistenz	Referenz
pAG426GAL- TDP-43-wt	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	Johnson <i>et al.</i> 2009
pAG426GAL- TDP-43-M337V	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	Johnson <i>et al.</i> 2009
pAG426GAL- TDP-43-Q331K	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GAL1</i>	<i>AmpR</i>	Johnson <i>et al.</i> 2009

**Tab. 3: Primer für die Deletionsnachweis- bzw. Paarungstyp- (*Mating Type*) PCR.**

Primer	Sequenz (5' - 3')
ATG1a	AAGTTAAGTACCAAGGCCATCTTTT
ATG1b	TAAAATGGGTAAGTTGTAGATCCCA
ATG1c	CTGAAAATCAAACCTTTGGAAGAAAA
ATG1d	TATAGCCAAAGGCAAGTACTAAACG
ATG15a	GAAAGCATTTCAGTTGAATACAGT
ATG15b	AAGTAGTAAGCAATAAGGCAGAGCA
PEP4a	AGTAAAGAAGTTTGGGTAATTCGCT
PEP4b	TCAGTGTAATATTGTGCGTTCAAGT
RPN4a	CTAATAGCCGTTTACAGTGATGGTT
RPN4b	TATCCGTTAAGGTTCTTTTTAGGCT
RPN4c	TAGTAACAGTAATGAAAACGGCACA
RPN4d	CAAGAATGTTGATATTCCAATGGT
UBI4a	AATAATCCTGGATAAACCAATTTTCG
UBI4b	GGATGTTGTAGTCAGACAAGGTTCT
UBI4c	AGAACCTTGTCTGACTACAACATCC
UBI4d	CTTTCCCTTTTGGTAGTCACAATA
VAM3a	GACACAGGAAGAGCAAACTAAGAT
VAM3b	TGGATGTCTTTTCTTTCCTTAGATG
kanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTA
kanC	TGATTTTGATGACGAGCG
Mat1	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG

Primer	Sequenz (5' - 3')
Mat2	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
Mat3	ACTCCAATTCAAGTAAGAGTTTG

### 3.2 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die *E. coli* TOP10 Zellen wurden mit Hilfe von LB-Medium kultiviert. Dieses bestand aus 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl und für die Herstellung von Platten aus 1,5% Agar. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme erfolgte die Zugabe von Ampicillin (Amp., 1 ml/l, 0,1 mg/ml). Die Zellkultivierung aus einer *E. coli* Kryokultur erfolgte direkt durch das Animpfen von LB-Flüssigmedium (+Amp.) oder durch das Ausstreichen auf eine LB-Platte (+Amp). Die Inkubationstemperatur betrug 37°C und die Schüttelgeschwindigkeit im Falle einer Flüssigkultur 150 rpm.

Für die Lagerung von *E. coli* TOP10 Zellen wurde eine stationäre Kultur 1:1 mit 30%igem Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

### 3.3 Plasmidtransformation in *E. coli*

Die in dieser Arbeit erwähnten Plasmide sind in der Tabelle 2 aufgeführt und wurden in Puffer oder auf Filterpapier zur Verfügung gestellt. Bei Letzterem erfolgten die Elution des Plasmids mittels EB-Lösung (QIAGEN®, Hilden, Deutschland) und die Überführung in ein Reaktionsgefäß.

Für die Plasmidtransformation wurde ein 50 µl Aliquot hitzekompetenter *E. coli* TOP10 Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Plasmid-DNA resuspendiert. Es erfolgten eine Inkubation der Zellen für 10 Min. auf Eis und ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Danach wurden die Zellen auf Eis gekühlt und in 500 µl SOC-Medium (2% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,0186% KCl, 1% 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1% 1 M MgSO<sub>4</sub>, 0,4% Glukose, 0,05% NaCl, pH 7) für 30 Min. bei 37°C unter Schütteln (600 rpm) kultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 Min., 900 rcf) erfolgten die Abnahme von 400 µl des Überstandes und das Vermengen des Zellpellets mit dem restlichen SOC-Medium. Die Kultur wurde auf eine Ampicillin-haltige LB-Platte (LB+Amp.) verteilt und für einen Tag bei 37°C kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde entweder erneut auf eine LB+Amp. Platte überstrichen oder direkt in 50 ml LB+Amp. Flüssigmedium angeimpft. Die Zellen wurden über Nacht im Kolben

angezogen (37°C, 150 rpm). Es erfolgte die Herstellung einer Kryokultur (siehe Abschnitt 3.2) oder die Plasmidisolation mittels QIAGEN® Plasmid *Plus* Kit (siehe Abschnitt 3.4).

## 3.4 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Isolation des Plasmids erfolgte über die Zentrifugation (10 Min., 4°C, 2880 rcf) einer 50 ml stationären *E. coli* TOP10 Kultur, welche über Nacht in Ampicillin-haltigem Flüssigmedium angezogen wurde. Die Reinigung der Plasmid-DNA wurde gemäß den Angaben des Herstellers QIAGEN® durchgeführt und die DNA-Konzentration anhand des NanoDrop™1000 Spectrophotometers (Thermo Scientific™, Wilmington, USA) photometrisch bei 260 nm bestimmt.

## 3.5 Kultivierung und Lagerung der Hefestämme

### 3.5.1 Allgemeines

Die Hefestämme wurden standardmäßig mittels nährstoffreichem Vollmedium (YP), synthetischem Komplet- (SC) oder synthetischem Minimalmedium (SM) kultiviert (Sherman 2002). Das Vollmedium enthielt 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose (Dextrose, D) und 2% Agar für die Herstellung von Platten. Die bei -80°C tiefgefrorenen, untransformierten Hefestämme wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert.

Für die Selektion von transformierten Stämmen wurden synthetische Medien verwendet. Diese setzten sich aus 0,67% Hefe-Stickstoff-Medium (YNB, mit Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren) und 2% einer Kohlenstoffquelle, wie Glukose (SCD/SMD), Galaktose (SCGal/SMGal) oder Raffinose (SCRD/SMRD) bzw. einer Kombination von diesen, zusammen. Ferner enthielten die SC-Medien einen Supplementmix, welcher mehrere Aminosäuren enthielt (Sherman 2002). Für die Herstellung von Platten wurde 2% Agar hinzugefügt. In Abhängigkeit des Stammhintergrundes und der Plasmidmarker wurden die Einzelkomponenten Tryptophan (Trp), Histidin (His), Methionin (Met), Leucin (Leu), Lysin (Lys) und Uracil (Ura) zugegeben (Sherman 2002). Für die Genrepression von TDP-43 (ausschließlich bei den pCM190 Konstrukten) enthielten die Selektionsmedien zusätzlich das Antibiotikum Doxycyclin (Dox, Sigma-Aldrich®, Endkonz.: 10 µg/ml bei Platten und 2 µg/ml bei Flüssigmedien). Falls nicht anders beschrieben, wurden die Flüssigkulturen in 96 Deep-Well Platten ( $V_{\max} = 500 \mu\text{l}$ ) bei 250 rpm, in Röhrchen oder in Kolben bei 150 rpm kultiviert. Die Inkubationstemperatur betrug sowohl bei Flüssigmedien als auch bei Platten 30°C.

Die in die Hefestämme transformierten Plasmide unterlagen der Kontrolle von endogenen, konstitutiven (GPD, CMD1, ADH1) oder regulierbaren (induzierbaren bzw. reprimierbaren) Promotoren (GAL1/10, Met25, TetOff). Die Galaktose-induzierbaren Promotoren GAL1 bzw. GAL10 sowie die Doxycyclin-reprimierbaren TetOff-Promotoren waren von besonderer Bedeutung (siehe Tab. 2). Grundsätzlich galt bei allen Experimenten folgende Herangehensweise: Für die Genexpression von induzierbaren Plasmiden wurden die Hefen zunächst in einer Übernachtskultur in Nichtexpressionsmedium angeimpft. Die Zellen erreichten die stationäre Phase und wurden anschließend in Nichtexpressionsmedium auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 verdünnt und für sechs bis acht Stunden inkubiert. Die logarithmisch wachsenden Kulturen wurden danach pelletiert und im gleichen Volumen an Expressionsmedium aufgenommen (Medienwechsel). In Abhängigkeit des Promotors erfolgte die Aktivierung der Genexpression durch den Wechsel in Medium ohne Doxycyclin (TetOff) bzw. Methionin (MET25) oder durch den Austausch der Kohlenstoffquelle Glukose in Galaktose (GAL1, GAL10). Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit ihren Charakteristika sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Die Hefekulturen wurden in einem Glycerin-Stock (15% Glycerin) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

### 3.5.2 Kultivierungsbedingungen zur Herstellung von Doppeldeletionsstämmen

Für die Generierung von Doppelmutanten wurden zwei Deletionsstämme unterschiedlichen Paarungstyps (MATa und MAT $\alpha$ ) in 500  $\mu\text{l}$  YPD Medium für 6 Std. bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Paarung der haploiden Zellen, erkennbar durch deren Ausflockung im Medium, wurden 100  $\mu\text{l}$  der Hefekultur auf synthetisches Komplettmedium ohne Methionin und Lysin (SCD-Met-Lys) ausplattiert. Das diente der Selektion auf diploide Zellen. Nach einem Tag der Inkubation erfolgte der Umstrich auf frische SCD-Met-Lys Platten. Für die anschließende Sporulation wurden die diploiden Zellen auf Platten mit 1% Kaliumacetat, 0,005% Zinkacetat, 0,25% Uracil, 0,05% Histidin und 0,15% Leucin übertragen. Die Sporulation erfolgte bei  $22^{\circ}\text{C}$  für ein bis zwei Wochen. Die Tetraden wurden auf YPD-Platten dissektiert und mehrere Tage inkubiert (siehe Abschnitt 3.6). Anschließend wurden die Tetraden zur Kontrolle des Auxotrophiemarkers auf synthetische Komplettmedien (SCD-Met oder SCD-Lys) übertragen und bei  $30^{\circ}\text{C}$  angezogen. Ferner erfolgte die Kultivierung auf YPD Platten mit 0,25 mg/ml G418 (Geneticin) zur Überprüfung der Gendeletion.

### 3.5.3 Kultivierungsbedingungen für transformierte, dem Tüpfeltest bestimmte Stämme

Die für die verschiedenen Tüpfeltests verwendeten transformierten Hefekulturen wurden über Nacht in 96 Deep-Well Platten mit 300 µl Nichtexpressionsmedium kultiviert. Diese waren in Abhängigkeit des Experiments SCD-Ura+Dox (beim Tüpfeltestscreen), SCD-Ura-Leu+Dox (beim *VAM3*-Komplementationsassay) und SCD-Ura (beim Tüpfeln der TDP-43-Varianten Q331K und M337V). Anschließend wurden die Stämme auf eine einheitliche optische Dichte von 0,2 OD<sub>600</sub> normalisiert und in fünf Verdünnungsstufen (je 1:10) in ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Pro Verdünnungsstufe wurden 5 µl Kultur auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten getüpfelt. Hierbei handelte es sich beim Tüpfeltestscreen um SMD+His+Leu+Lys (bzw. SMD-Ura) mit oder ohne Doxycyclin, bei der Komplementation mit *VAM3* um SCD-Ura-Leu+/-Dox und beim Wachstumstest unterschiedlicher TDP-43-Varianten um SMD+His+Leu+Lys bzw. SMDGal+His+Leu+Lys (oder SMDGal-Ura, 0,02% Glu., 2% Gal.). Beim letzten experimentellen Ansatz wurde den Platten zusätzlich die pharmakologisch wirksame Substanz Propranolol (2 mM, Sigma<sup>®</sup>) beigemischt. Hiermit sollte eine Fragmentierung der Vakuolen in den Hefezellen forciert werden (siehe Abschnitt 3.8). In einem Vorexperiment, zum Ermitteln des optimalen Propranololgehalts, wurden wildtypische Hefen mit einem pCM190 Konstrukt über Nacht in 300 µl SCD-Ura+Dox Medium angezogen und auf SMD+His+Leu+Lys+/-Dox (bzw. SMD-Ura+/-Dox) Platten mit unterschiedlichen Propranololkonzentrationen (0; 1; 1,5; 2 mM) getestet. Die deutlichsten Effekte traten bei 2 mM auf. Zur Überprüfung der vakuolären Fragmentierung mit und ohne Propranolol bei einer TDP-43-Expression wurden die Zellen nach drei Tagen von der Platte in ddH<sub>2</sub>O überführt, mit CMAC (7-Amino-4-chloromethylcoumarin, Stammkonzentration: 10 mM, CellTrackerBlue, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) inkubiert und mikroskopisch analysiert (siehe Abschnitt 3.8 und 3.10). Die Selektionsplatten aller Tüpfeltestassays wurden für drei bzw. sechs Tage bei 30°C kultiviert und dokumentiert.

### 3.5.4 Kultivierungsbedingungen für CMAC und Lucifer Yellow behandelte Zellen

Die mikroskopische Auswertung der mittels CMAC markierten Vakuolen erfolgte nicht nur bei Zellen auf Medienplatten, sondern auch von in Flüssigmedium angewachsenen Kulturen. So wurden wildtypische Zellen mit einem pCM190 Konstrukt in 300 µl SMD+His+Leu+Lys+Dox (bzw. SMD-Ura+Dox) Nichtexpressionsmedium angeimpft und über Nacht inkubiert. Die stationäre Kultur wurde mit frischem Nichtexpressionsmedium

verdünnt und nach 7 Std. in das Expressionsmedium (SMD-Dox) überführt. Die Zellen wurden geerntet und mit CMAC gefärbt. Bei Zellen mit verschiedenen ALS-assoziierten TDP-43-Varianten erfolgte derselbe experimentelle Ablauf. Bei dem Nichtexpressionsmedium handelte es sich um SMD+His+Leu+Lys welches durch SMDGal (0,5% Glu., 1,5% Gal., identische Supplemente) ausgetauscht wurde. Auch bei einigen Kolokalisationsstudien wurde CMAC zur Vakuolenmarkierung eingesetzt. Die Medien zur Genrepression und -expression richteten sich nach den transformierten Plasmiden (siehe Tab. 2). Detaillierte Angaben zur Medienzusammensetzung sind für jedes Experiment im Ergebnissteil aufgeschlüsselt. Prinzipiell wurden auch diese Kulturen über Nacht angezogen, in die logarithmische Phase durch Medienzugabe überführt und in Expressionsmedium resuspendiert. Nach ca. 16 Std. wurden die Zellen geerntet, mit CMAC behandelt und mikroskopisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.10).

Die Anzucht von Lucifer Yellow gefärbten Zellen erfolgte im Flüssigmedium. Wildtypzellen mit einem pCM190 Plasmid wurden in 500 µl synthetisches Minimalmedium (SMD+His+Leu+Lys+Dox) angeimpft und im Röhrchen (30°C, 150 rpm, über Nacht) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die Einstellung der Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 in 1 ml Nichtexpressionsmedium mit Hilfe des BioMate<sup>TM</sup> 3 Spectrophotometers (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) und die Kultivierung für 6 – 7 Std. Die logarithmische Kultur wurde in 1 ml SMD+His+Leu+Lys Expressionsmedium überführt und erneut über Nacht angezogen. Es erfolgten die Verdünnung der Kultur durch Zugabe von 2 ml frischem Expressionsmedium und die Inkubation für 3 Std. Anschließend wurden 1,5 ml Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt, pelletiert, in 90 µl SMD+His+Leu+Lys Medium resuspendiert und mit 10 µl Lucifer Yellow (Stammkonz.: 40 mg/ml, Sigma<sup>®</sup>) vermengt. Die Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert, mehrmals mit Kaliumphosphatpuffer (KPi) gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe Abschnitt 3.10).

### 3.5.5 Kultivierungsbedingungen gehungerter Zellen

Hefezellen, die zu einem späteren Zeitpunkt Hungerbedingungen ausgesetzt werden sollten, wurden zunächst in 300 µl Nichtexpressionsmedium angezogen. In Abhängigkeit des Versuchsaufbaus handelte es sich hierbei um SMD+His+Leu+Lys+Met (bzw. SMD-Ura+Met) oder SMGalRD+His+Lys (bzw. SMGalRD-Ura-Leu) Medium mit 2% Galaktose, 2% Raffinose, 0,02% Glukose und 2 µg/ml Doxycyclin. Das erste Medium wurde zur Auswertung der TDP-43-Aggregate in unterschiedlichen BY4742 Stämmen verwendet. Das synthetische Minimalmedium SMGalRD+/-Dox wurde für die Analyse der GFP-Atg8-

Prozessierung und der Atg8-PE-Konjugation eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über Nacht in 96 Deep-Well Platten bei 30°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen auf eine identische OD<sub>600</sub> von 0,1 bzw. 0,2 bei einem Gesamtvolumen von 500 µl Nichtexpressionsmedium mittels FLUOstar® Omega Mikroplatten-Readers (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) eingestellt. Es erfolgte eine Inkubation für weitere 6 - 7 Std. Nach einem Waschschrift wurden die Zellpellets mit Expressionsmedium (max. 500 µl, abhängig vom Zellwachstum) vermengt. Für die Aktivierung bzw. Steigerung der Genexpression wurde das Antibiotikum Doxycyclin oder die Aminosäure Methionin aus dem Medium entfernt. Ersteres erfolgte bei der Prozessierung bzw. Lipidierung von Atg8, letzteres bei der TDP-43-Aggregatanalyse bei den BY4742 Stämmen. Nach der Inkubation der Kulturen (über Nacht, 30°C) wurde die erste Probe zum Zeitpunkt t = 0 entnommen. Die restliche Hefekultur wurde erneut mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in SD-N (max. 300 µl) gehungert. Das Medium bestand aus 0,17% YNB (ohne Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren), 2% Glukose und den oben aufgeführten Einzelkomponenten. Hinsichtlich des Experiments wurde nach 1 - 4 Std. (bei GFP-Atg8-Prozessierung), 24 Std. (bei Atg8-PE-Konjugationsassay) bzw. nach 6 und 24 Std. (bei Analyse der TDP-43-Aggregate) Probenmaterial entnommen, teilweise fixiert und mittels Western Blot Analyse oder Mikroskopie untersucht (siehe Abschnitt 3.10, 3.11 und 3.12).

Für die Bestimmung des TDP-43-Abbaus im Wildtyp und in verschiedenen Deletions- bzw. Doppeldeletionsstämmen wurde eine ähnliche Prozedur verwendet. Es erfolgten die Anzucht der Zellen in SMGalRD+His+Leu+Lys+Dox und die Überführung in die logarithmische Phase mittels Zugabe frischen Mediums. Die Plasmidexpression wurde nach 6 - 7 Std. durch den Wechsel zu SMGalRD induziert. Es erfolgten eine Inkubation über Nacht und die erste Probenentnahme (t = 0 Std.). Anschließend wurden die Kulturen gewaschen und in SD-N Medium resuspendiert. Dieses enthielt, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten, das Antibiotikum Doxycyclin für die TDP-43 Repression. Die Proben wurden nach 1, 2, 4, 6, 24, und 48 Std. Hungern entnommen und mit Hilfe des Western Blots analysiert (siehe Abschnitt 3.11 und 3.12).

### 3.5.6 Kultivierungsbedingungen für Rsp5-Mutationsstämmen und Ste3- bzw. Sna3-exprimierende Stämme

Die Rsp5-Varianten wurden hinsichtlich der TDP-43-GFP-Punkte und des TDP-43-GFP-Levels mikroskopisch oder biochemisch analysiert. Die Hefen mit einem BY4741 Stammhintergrund wurden in SCD-His Medium über Nacht kultiviert und am nächsten Tag in

die logarithmische Phase durch Medienzugabe überführt. Anschließend erfolgte der Austausch des Mediums in SCGal-His. Die Kultivierungsdauer im Expressionsmedium betrug ca. 16 Std. Die Zellen wurden geerntet und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie oder der Western Blot Analyse ausgewertet (siehe Abschnitt 3.10, 3.11 und 3.12).

Die Lokalisation von Ste3-GFP bzw. Sna3-GFP erfolgte mikroskopisch in wildtypischen Hefen bei gleichzeitiger TDP-43-Expression. Ferner wurde die Prozessierung von Sna3 biochemisch analysiert. Bei allen drei Ansätzen wurden die Zellen in 300 µl Nichtexpressionsmedium (SMD+Leu+Lys bzw. SMD-Ura-His) angezogen, am nächsten Tag bei einer OD<sub>600</sub> auf 0,15 in 500 µl SMD+Leu+Lys eingestellt und für ca. 6 Std. inkubiert. Der Expressionsbeginn erfolgte durch den Wechsel in SMGal+Leu+Lys (bzw. SMGal-Ura-His) Medium. Nach ca. 16 Std. Kultivierung wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot oder Mikroskopie untersucht (siehe Abschnitt 3.10, 3.11 und 3.12).

### 3.5.7 Kultivierungsbedingungen für SILAC-Kulturen

Der SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) Wildtypstamm enthielt ein pESC-His-Kontroll- bzw. -TDP-43-codierendes Konstrukt (siehe Abschnitt 3.7) und wurde auf synthetischem Komplettmedium nach Sherman (2002) ohne Histidin mit 80 mg/l Lysin, 50 mg/l Arginin und 30 mg/l Prolin ausplattiert. Die Zellen wurden in Röhrchen oder Kolben mit Medien inkubiert, die entweder die leichten Aminosäuren Lysin und Arginin (Lys0 und Arg0) oder aber die schweren isotope markierten Aminosäuren Lys8 und Arg10 (Silantes, München, Deutschland) enthielten. Um eine optimale Markierungseffizienz der schweren Aminosäuren zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation fortlaufend über mehrere Tage in frischem SCD-His Medium. Nach insgesamt fünf Tagen in Nichtexpressionsmedium wurden die Zellen in einer Übertagkultur, mit 200 ml SCD-His und einer Ausgangs-OD<sub>600</sub> von 0,15, in die logarithmische Phase überführt. Nach einer Inkubationsdauer von 6 Std. erfolgten die Überführung der Kulturen in Expressionsmedium mit 1,8% Galaktose und 0,2% Glukose (SCDGal-His) und die Anzucht für 20 Std. bei 30°C. Das Volumen des Expressionsmediums variierte in Abhängigkeit der gemessenen OD<sub>600</sub> zwischen 218 und 250 ml. Ziel war die Angleichung der Zellkonzentrationen aller vier Kulturen durch eine entsprechende Verdünnung mit dem Nährmedium. Im Anschluss an die 20-stündige Inkubation wurden das Zellwachstum mittels Photometer bestimmt und die Kulturen mit Kontroll- und TDP-43-codierendem Plasmid im Verhältnis 1:1 vermischt. Die Mischkulturen wurden mehrfach mit 1x PBS gewaschen, pelletiert und für den Zellaufschluss vorbereitet (siehe Abschnitt 3.13). In einem biologischen Replikat erfolgte der Austausch des Mediums

zwischen den Kontroll- und den TDP-43-exprimierenden Kulturen, so dass schlussendlich zwei Mischkulturen vorlagen.

### 3.6 Herstellung von Doppeldeletionsstämmen

Nach der erfolgreichen Paarung, Selektion und Sporulation (siehe Abschnitt 3.5.2) erfolgte die Überprüfung der Sporulationseffizienz mittels Lichtmikroskopie. War diese ausreichend, wurde eine geringe Zellmenge in 185  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 7  $\mu\text{l}$  Zymolyase 20T (Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japan, Stammkonzentration: 40 mg/ml), zur enzymatischen Zersetzung der Ascuswand, vermengt. Die Inkubation erfolgte für 10 Min. bei RT. Anschließend wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension partiell auf eine YPD-Platte verteilt und getrocknet. Es erfolgten die Separierung der Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer MSM System series 300 mit acer n30 Pocket PC, Singer Instruments, Roadwater, GB) und das Ablegen der Sporen auf die restliche YPD-Platte. Die vereinzelteten Zellen wurden für ein bis zwei Tage bei 30°C angezogen. Danach erfolgten die Übertragung der Kulturen auf verschiedene Selektionsplatten und die Überprüfung hinsichtlich ihrer Auxotrophie und Deletion (siehe Abschnitt 3.5.2). Eine genauere Untersuchung der geeigneten Klone erfolgte per Deletionsnachweis- und Paarungstyp- (*Mating Type*) PCR.

Zur Vorbereitung auf die PCR wurde die genomische DNA mit dem MasterPure™ Yeast Pure Purification Kit (epicentre® eine Illumina® company, Madison, Wisconsin, USA) aus den Hefezellen isoliert. Die Zellen wurden aus YPD-Flüssigmedium geerntet. Die DNA-Präparation erfolgte mit geringen Abweichungen nach den Angaben des Herstellers. So wurden 200  $\mu\text{l}$  statt 300  $\mu\text{l}$  Yeast Cell Lysis Solution und 100  $\mu\text{l}$  statt 150  $\mu\text{l}$  MPC Protein Precipitation Reagent eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop™ Photometers bei 260 nm ermittelt und auf 50 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Die genomische DNA wurde anschließend bei -20°C eingefroren oder direkt für die PCR verwendet.

Mit Hilfe der PCR erfolgten die Ermittlung des Paarungstyps und der Deletionen. Die Reagenzien wurden, mit Ausnahme der Primer, der DNA und dem H<sub>2</sub>O, von Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA) erworben. Bei dem PCR-Gerät handelt es sich um den Mastercycler® Gradient EP S von Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Das Pipettierschema, die Primerkombination und das PCR-Programm für den Deletionsnachweis sind in den Tabellen 4, 5 und 6 aufgeführt. Die Elongationszeit variierte in Abhängigkeit des zu amplifizierenden PCR-Produkts.

**Tab. 4: Pipettierschema für die Deletionsnachweis-PCR.**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l] für einen Ansatz
<i>5x Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer</i>	4
<i>PCR Nucleotide Mix (10 mM)</i>	0,4
ddH <sub>2</sub> O	14,12
<i>Forward Primer (100 <math>\mu</math>mol)</i>	0,2
<i>Reverse Primer (100 <math>\mu</math>mol)</i>	0,2
GoTaq <sup>®</sup> G2 DNA-Polymerase (5 u/ $\mu$ l)	0,08
genomische DNA (50 ng/ $\mu$ l)	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tab. 5: Primerkombination für den Nachweis des Wildtyp- oder Deletionsallels mittels PCR.**

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Allel
<i>ATG1</i>	ATG1a	ATG1b	wildtypisch
	ATG1a	kanB	deletiert
	ATG1c	ATG1d	wildtypisch
	ATG1d	kanC	deletiert
<i>ATG15</i>	ATG15a	ATG15b	wildtypisch
	ATG15a	kanB	deletiert
<i>PEP4</i>	PEP4a	PEP4b	wildtypisch
	PEP4a	kanB	deletiert
<i>RPN4</i>	RPN4a	RPN4b	wildtypisch
	RPN4a	kanB	deletiert
	RPN4c	RPN4d	wildtypisch
	RPN4d	kanC	deletiert
<i>UBI4</i>	UBI4a	UBI4b	wildtypisch
	UBI4a	kanB	deletiert
	UBI4c	UBI4d	wildtypisch
	UBI4d	kanC	deletiert
<i>VAM3</i>	VAM3a	VAM3b	wildtypisch
	VAM3a	kanB	deletiert

**Tab. 6: PCR-Programm für den Nachweis einer Gendeletion.**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	5 Min.	Initiale Denaturierung
35	95°C	1 Min.	Denaturierung
	50°C	30 Sek.	Annealing
	72°C	1.30 Min. – 3.30 Min.	Elongation
1	72°C	5 Min.	Finale Elongation
	10°C	∞	

Der Ansatz für die Paarungstyp-PCR und dessen Programm sind in den Tabellen 7 und 8 aufgeführt.

**Tab. 7: Pipettierschema für die Paarungstyp-PCR.**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l] für einen Ansatz
<i>5x Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer</i>	4
<i>PCR Nucleotide Mix (10 mM)</i>	0,4
ddH <sub>2</sub> O	13,92
Mat1 Primer (100 $\mu$ M)	0,2
Mat2 Primer (100 $\mu$ M)	0,2
Mat3 Primer (100 $\mu$ M)	0,2
GoTaq <sup>®</sup> G2 DNA-Polymerase (5 u/ $\mu$ l)	0,08
genomische DNA (50 ng/ $\mu$ l)	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tab. 8: PCR-Programm für den Nachweis des Paarungstyps.**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	5 Min.	Initiale Denaturierung
35	95°C	1 Min.	Denaturierung
	50°C	30 Sek.	Annealing
	72°C	1.30 Min.	Elongation

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	72°C	5 Min.	Finale Elongation
	10°C	∞	

Das amplifizierte PCR-Produkt wurde zusammen mit einem DNA-Längenstandard (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder) auf ein 0,8%iges Agarosegel (Biozym LE Agarose in 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,35) gelöst und aufgekocht) aufgetragen. Die Probe wurde für ca. 30 Min. elektrophoretisch (Spannungsquelle von Amersham Biosciences, GB) bei 120 V getrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Anschließend erfolgten die Färbung des Agarosegels im Ethidiumbromidbad für 10 - 15 Min. und die Detektion mittels UV-Licht (VWR® GenoSmart und GenoView, Radnor, Pennsylvania, USA).

### 3.7 High-efficiency Transformation von Hefe

Für die High-efficiency Transformation wurden die Hefestämme in einer Übernachtskultur (ca. 15 ml YPD) bei 30°C und 150 rpm kultiviert. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> mit Hilfe des BioMate™ 3 Spectrophotometers. Anschließend wurden die Kulturen auf eine identische Ausgangs-OD<sub>600</sub> von 0,5 in 50 ml YPD eingestellt und für 2 - 3 Std. inkubiert. Es erfolgte eine Wachstumskontrolle der logarithmischen Kultur, welche idealerweise 0,8 – 1 OD<sub>600</sub> betrug. Daran schloss sich ein zweimaliger Waschschrift (5 Min., 2880 rcf) an. Anschließend wurden die Zellpellets in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und pro Versuchsansatz jeweils 100 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aliquotiert. Die Kultur wurde aufkonzentriert (30 Sek., 18000 rcf), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit dem Transformationsmix (T-Mix: 240 µl 50% PEG 4000; 36 µl 1 M LiOAc (pH 7.4); 50 µl *carrier* DNA aus Lachsspermien (2 mg/ml); 34 µl ddH<sub>2</sub>O mit 1 – 2 µg Plasmid-DNA) vermengt. Die im T-Mix enthaltene *carrier* DNA wurde zuvor für 15 Min. bei 99°C aufgekocht und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Zellen, zusammen mit dem T-Mix, wurden für 30 Min. bei 42°C unter Schütteln inkubiert. Es erfolgten ein erneuter Zentrifugationsschritt (30 Sek., 5000 rcf) und das sorgfältige Entfernen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 1 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und ein Teil der Suspension auf synthetische Komplettmedien ausplattiert. Das Volumen variierte hierbei zwischen 200 und 400 µl, je nach Anzahl der transformierten Plasmide. Die getrockneten Selektionsplatten wurden für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Es erfolgten ein Reinigungsausstrich auf frische Selektionsplatten mit erneuter

Inkubation und das Animpfen in selektives Flüssigmedium, zur Herstellung von Kryostocks (siehe Abschnitt 3.5.1) bzw. für den experimentellen Gebrauch.

### 3.8 Bestimmung der Zytotoxizität in Hefe mittels *Serial Spot Dilution Assays* (Tüpfeltests)

Mit Hilfe des Tüpfeltestscreens wurde die TDP-43-bedingte Zytotoxizität in mehreren Deletionsstämmen bestimmt. Die Zytotoxizität konnte auf Grundlage der zellulären Wuchsdefekte ermittelt werden. Pro Stamm wurden jeweils vier verschiedene Hefeklone mit dem pCM190-Kontroll- oder -TDP-43-Plasmid untersucht. Die Anzucht der Zellen erfolgte im SCD-Ura+Dox Nichtexpressionsmedium (siehe Abschnitt 3.5.3). Die über Nacht kultivierten Zellen befanden sich zum Zeitpunkt des Experiments in der stationären Phase. Die exakte Bestimmung der Zelldichte erfolgte bei OD<sub>600</sub> mit Hilfe des Mikroplatten-Readers. Die Kulturen wurden auf eine einheitliche OD<sub>600</sub> von 0,2 mittels ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Es erfolgte die Generierung einer seriellen Verdünnungsreihe, mit insgesamt sechs Verdünnungsstufen in 1:10er Schritten. Pro Verdünnungsstufe wurden 5 µl der sorgfältig durchmischten Zellsuspensionen auf die synthetischen Minimalmedien SMD+His+Leu+Lys (oder SMD-Ura) bzw. SMD+His+Leu+Lys+Dox (bzw. SMD-Ura+Dox) aufgetragen. Die Selektionsplatten wurden bei 30°C kultiviert und nach drei bzw. sechs Tagen dokumentiert. Die quantitative Auswertung der Platten erfolgte durch die Berechnung des Wachstumsindex (siehe Abschnitt 3.9).

Im *VAM3*-Komplementationsassay wurden der Wildtyp und der  $\Delta$ *vam3*-Stamm mit zwei Plasmiden transformiert. Es handelte sich hierbei um das pCM190-Kontroll- oder -TDP-43-codierende Konstrukt und um das ZM552-Kontroll- oder -*VAM3*-codierende Plasmid. Es ergaben sich somit vier Kombinationsmöglichkeiten. Der Stamm enthielt entweder beide Kontrollplasmide, jeweils ein Kontroll- und ein proteincodierendes Konstrukt (TDP-43 bzw. *VAM3*) oder zwei Protein-codierende Plasmide (TDP-43 und *VAM3*). Pro Zusammensetzung wurden jeweilig zwei Klone auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt, mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und nach oben erwähntem Schema getüpfelt. Die Übertragung der Zellsuspension erfolgte auf SMD-Ura-Leu+/-Dox (bzw. SMD+His+Lys+/-Dox) Platten, welche nach drei bzw. sechs Tagen Inkubation fotografiert wurden.

Um das Wuchsverhalten von wildtypischen Zellen, welche mit einem TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert wurden, in Abhängigkeit des pharmakologischen Vakuolenfusionsinhibitors Propranolol zu untersuchen, erfolgte zunächst ein Test mit

mehreren Konzentrationen. Ein mit pCM190-Kontroll- bzw. -TDP-43-Konstrukt transformierter Wildtypstamm wurde auf SMD+His+Leu+Lys+Dox und auf SMD+His+Leu+Lys (bzw. SMD-Ura+/-Dox) mit jeweils 0, 1, 1,5 und 2 mM Propranolol getüpfelt. Das Vorgehen entsprach hierbei den oben beschriebenen Experimenten. Als optimale Konzentration wurde 2 mM festgelegt. In einem zweiten Versuch erfolgte die Analyse wildtypischer Hefen mit verschiedenen ALS-assoziierten TDP-43-Varianten. Jeweils zwei unabhängige Klone mit pAG426Gal-Kontroll, -TDP-43-wt, -TDP-43-Q331K oder -TDP-43-M337V Konstrukt wurden getüpfelt. Es wurden die Minimalmedien SMD+His+Leu+Lys (bzw. SMD-Ura) und SMDGal+His+Leu+Lys (SMDGal, 0,02% Glu., 2% Gal.) zur Genrepression bzw. -expression verwendet. Die Dokumentation der Platten erfolgte nach drei und sechs Inkubationstagen bei 30°C.

### 3.9 Auswertung des Tüpfeltestscreens

Mit Hilfe der quantitativen Analyse des Tüpfeltestscreens sollte das Zellwachstum der Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtypstamm ermittelt werden. Dafür wurde den Tüpfelplatten, mit ihren insgesamt sechs Verdünnungsstufen, ein Wachstumswert von Null bis Sechs zugeordnet. Konnte z. B. ein Wachstum bis in die fünfte Verdünnungsstufe beobachtet werden, erhielt der Klon den Wert Fünf ( $G = 5$ ). Lag keinerlei Wachstum vor, so wurde dies mit einer Null ( $G = 0$ ) gekennzeichnet. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Mittelwerts aller vier Klone bei allen vier Bedingungen. Diese fassten das Wachstum beim Wildtyp mit einem Kontroll- oder TDP-43-codierenden Plasmid bzw. die des Deletionsstamms mit einem Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt ( $G_{wt+Kontrolle}$ ,  $G_{wt+TDP-43}$ ,  $G_{\Delta+Kontrolle}$ ,  $G_{\Delta+TDP-43}$ ) zusammen. Die Berechnung des Wachstumsindex erfolgte über folgende Formel:

$$\text{Wachstumsindex} = \frac{(G_{\Delta+TDP-43} - G_{wt+TDP-43}) - (G_{\Delta+Kontrolle} - G_{wt+Kontrolle})}{|G_{\Delta+Kontrolle} - G_{wt+Kontrolle}| + 1}$$

Ein Wachstumsindex unter null signalisierte ein reduziertes Wachstum der Mutante gegenüber dem Wildtyp. Lag der Wert über null war das Wachstum des Deletionsstamms im Vergleich zum Wildtypstamm gesteigert.

Zum besseren Verständnis der arithmetischen Herangehensweise wurden exemplarisch einige Deletionsstämme nach drei Tagen Inkubation mit deren Wachstumsindex in Tabelle 9

aufgeführt. Eine ausführliche Darstellung aller im Screen untersuchten Deletionsstämme mit deren Wachstumsindex ist im Abschnitt 4.1 und im Anhang Abb. I und II zu finden.

**Tab. 9: Exemplarische Wachstumsindizes ausgewählter Deletionsstämme.** Auflistung des Wachstums aller vier Klone, welche entweder ein Kontroll- oder ein TDP-43-codierendes Plasmid enthielten, dem daraus resultierenden Mittelwert (MW) und der Berechnung des Wachstumsindex.

	Wachstum <sub>Kontrolle</sub>				MW	Wachstum <sub>TDP-43</sub>				MW	Wachstumsindex
wt BY4742	5	5	5	4	4,75	3	4	3	3	3,25	0,000
$\Delta vps28$	4	4	3	4	3,75	0	0	0	0	0,00	-1,125
$\Delta vps60$	4	6	6	5	5,25	3	3	2	3	2,75	-0,667
$\Delta vta1$	5	4	4	4	4,25	3	4	5	4	4,00	0,833

### 3.10 Färbung von Hefezellen und Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Hefekulturen zunächst, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, kultiviert und in Abhängigkeit der Fragestellung mit einem Farbstoff inkubiert, mit Formaldehyd fixiert (siehe unten) oder direkt analysiert.

Zur Charakterisierung der genomischen DNA, der vakuolären Fragmentierung und der endosomal-vakuolären Aktivität wurden die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Stammkonz.: 1 mg/ml, Sigma<sup>®</sup>), CMAC oder Lucifer Yellow gefärbt.

Für die Messung der Vakuolenfragmentierung mit Hilfe des Vakuolenfarbstoffs CMAC wurden wildtypische Hefen mit dem Doxycyclin-regulierbaren pCM190 Konstrukt in Flüssigmedium oder auf Platte angezogen. Die genauen Kultivierungsbedingungen sind in Abschnitt 3.5.4 beschrieben. Von den stationären, über Nacht in flüssigem Expressionsmedium kultivierten Stämmen wurden 200  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l CMAC (Stammkonz.: 10 mM) gefärbt und für 30 Min. bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Es erfolgte das Entfernen des Farbstoffs über mehrmaliges Waschen in ddH<sub>2</sub>O und das Resuspendieren in 20  $\mu$ l Wachstumsmedium (SMD+His+Leu+Lys bzw. SMD-Ura). Die aufkonzentrierte Suspension wurde anschließend mikroskopiert (siehe unten). Kulturen, welche auf Expressionsplatten (SMD+His+Leu+Lys bzw. SMD-Ura) ohne oder mit 2 mM Propranolol für drei Tage bei 30°C wuchsen, wurden von der Agarplatte abgekratzt und in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Das weitere Prozedere zur Färbung der Vakuolen mit CMAC entsprach dem, der in Flüssigmedium angezogenen Kulturen. Die Bestimmung der Vakuolenfragmentierung in wildtypischen Zellen mit verschiedenen ALS-assoziierten TDP-43-Varianten erfolgte durch

das Induzieren des Galaktose-regulierbaren Promotors über Nacht in SMDGal (0,5% Glu., 1,5% Gal.) Flüssigmedium.

Bei der mikroskopischen Auswertung zur Vakuolenfragmentierung wurden über 100 Zellen bei mehreren Klonen, in wenigstens zwei unabhängigen Experimenten analysiert. In Abhängigkeit ihrer Vakuolenanzahl erfolgte die Zuordnung der Zellen einer bestimmten Gruppe (ein, zwei, drei oder mehr als drei Vakuolen).

Neben der Charakterisierung vakuolärer Fragmentierung erfolgte die CMAC-Behandlung bei einigen Kolokalisationsstudien zwischen einem fluoreszenzmarkierten Protein (z. B. Sna3-GFP) und einem C-terminal GFP- oder DsRed-markierten TDP-43. Die über Nacht in flüssigem Expressionsmedium kultivierten Stämme (siehe Abschnitt 3.5) wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und in einem Verhältnis von 1:100 mit CMAC gefärbt. Anschließend erfolgten die Anreicherung der gewaschenen Kulturen und deren Mikroskopie (siehe unten).

Der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow ist ein Naphthalimid-Derivat, welches über die Endozytose in die Zelle aufgenommen und primär zur Bestimmung der endosomal-vakuolären Aktivität in *S. cerevisiae* eingesetzt wird (Stewart 1978, 1981). Gleichzeitig ermöglicht der Farbstoff die Analyse der Vakuolenmorphologie, da der Farbstoff letztendlich in die Vakuole gelangt. Dies erlaubte eine Auswertung der Zellen analog zur Untersuchung mit CMAC. Zur Bestimmung der endosomal-vakuolären Aktivität wurden wildtypische Zellen, die ein pCM190-Kontroll- oder -TDP-43-Plasmid enthielten, nach einigen Tagen der Vorinkubation (siehe Abschnitt 3.5.4) durch Zugabe frischen Mediums in die logarithmische Phase überführt und mit Lucifer Yellow (Stammkonz.: 40 mg/ml) 1:10 behandelt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem Kaliumphosphatpuffer (KPi) gewaschen, in 50 µl KPi resuspendiert und mittels GFP-Filter mikroskopiert (siehe unten).

Bei umfangreichen experimentellen Ansätzen, wie bei der Bestimmung der TDP-43-Aggregation in unterschiedlichen Deletions- und Doppeldeletionsstämmen zu mehreren Zeitpunkten, wurden die Zellen zusätzlich mit 37%igem Formaldehyd fixiert. Die Zellsuspension wurde mit Formaldehyd im Verhältnis 1:10 versetzt und bei RT für 30 Min. inkubiert. Anschließend erfolgten ein zwei- bis dreimaliger Waschschrift (5 Min., 2880 rcf) mit 1xPBS und die Resuspension des Zellpellets in ddH<sub>2</sub>O.

Die Zellproben wurden zur mikroskopischen Analyse konzentriert, 1:1 mit 0,5%iger Agarose Low Melt (Roth<sup>®</sup>, Karlsruhe Deutschland) vermennt und zwischen Objektträger und Deckglas immobilisiert. Die Analyse der Mikroskopiepräparate erfolgte mit dem Axiophot

Epifluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung des Plan-Neofluar 100x/1.30 Ph3 Öbobjektivs (Carl Zeiss). Ferner war das Mikroskop mit einem DIC-, DAPI-, DsRed- (TxRed ET) und GFP- (AHT EGFP HC) Filterset ausgestattet. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer Leica DCF360FX Kamera und wurden mit der Leica LAS AF Version 2.2.1 Software (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verarbeitet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Adobe Photoshop CS5 Software (Adobe Systems Inc., München, Deutschland). Es wurden ausschließlich Veränderungen in Helligkeit, Kontrast und Tonwert vorgenommen. Darüber hinaus wurden den Kanälen Falschfarben zugeordnet. So erhielten z. B. CMAC-gefärbte Zellen die Farbe blau und GFP-markierte Proteine die Farbe grün. Die separaten Kanäle wurden in einer Überlagerung zusammengefasst, um Kollokalisierungen der Proteine detektieren zu können.

### 3.11 Herstellung von Hefezelleextrakten

Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge einer geernteten Zellprobe musste die genaue Zelldichte mit Hilfe des Mikroplatten-Readers bei  $OD_{600}$  ermittelt werden. Die restliche Kultur wurde pelletiert (30 Sek., 18000 rcf) und nach der Methode von Kushnirov 2000 mit kleineren Modifikationen oder nach Yen *et al.* 2007 aufgeschlossen. Bei der ersten Variante erfolgten das Vermischen des Zellpellets mit 200  $\mu$ l 0,1 M NaOH Lösung und die Inkubation für 10 Min. bei RT. Nach einer erneuten Zentrifugation erfolgte die Zugabe des SDS-Probenpuffers (5% Glycerin, 2% SDS, 4%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 60 mM Tris-HCl, Bromphenolblau). Das Volumen des Laemmli-Puffers (in  $\mu$ l) richtete sich nach der Wachstumsdichte der geernteten Zellen (gemessene  $OD_{600}$  \* Verdünnungsfaktor), dem Ausgangsvolumen der entnommenen Probe ( $V_{Zellen}$  in ml), der gewünschten Proteinmenge auf der Membran (soll  $OD_{600}$ , diese betrug 0,1 bis 0,3) und dem Auftragsvolumen in die Geltaschen ( $V_{Auftrag}$ , diese betrug entweder 10 oder 15  $\mu$ l). Somit ergab sich folgende Formel:

$$V_{\text{SDS-Probenpuffer}} [\mu\text{l}] = \frac{\text{gemessene } OD_{600} * \text{Verdünnungsfaktor} * V_{\text{Zellen}} * V_{\text{Auftrag}}}{\text{soll } OD_{600}}$$

Der Probenpuffer wurde sorgfältig mit dem Zellpellet resuspendiert und für 15 Min. bei 99°C aufgeköcht. Für die spätere Verwendung des Zellextraktes erfolgte das Einfrieren bei -80°C oder das Herunterkühlen auf Eis für den sofortigen Gebrauch.

Die Methode nach Yen *et al.* (2007) wurde ausschließlich für den Atg8-PE-Lipidierungsassay verwendet. Hierfür erfolgten das Vermengen des Zellpellets mit 200 µl 10%igem TCA (Trichloressigsäure) und die Inkubation für 15 Min. auf Eis. Nachdem die Suspension zentrifugiert (5 Min., 18000 rcf) und der Überstand entfernt wurde, erfolgten ein Waschschrift mit 100%igem Aceton und ein zweiter Zentrifugationsschritt (5 Min., 18000 rcf). Das Pellet wurde luftgetrocknet und mit MURB-Puffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM MES, 3 M Harnstoff, 0,5% β-Mercaptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0,05% Bromphenolblau, 1% SDS) resuspendiert. Das Volumen des MURB-Puffers berechnete sich aus der oben aufgeführten Formel. Der Extrakt enthielt neben dem Puffer 0,25 bis 0,5 mm große Glasperlen. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte mittels eines Disruptors (Disruptor Genie<sup>®</sup> Scientific Industries, VWR International) für 5 Min. und mit einem Wärmeschüttler für 10 Min. bei 70°C. Nach Zugabe von 100%igem Glycerin, wobei das eingesetzte Volumen 10% des Gesamtvolumens entsprach, wurde der Extrakt bei -80°C eingefroren oder sofort auf ein Harnstoffgel aufgetragen.

### 3.12 SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Die Proteinauftrennung erfolgte in 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen oder in 15%igen SDS-Polyacrylamid-Harnstoffgelen. Die SDS-Gele setzten sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen. Die Harnstoffgele bestanden aus einem Bodengel mit 2% Agar, einem Trenn- und einem Sammelgel. Die genauen Bestandteile beider Gelarten sind in den Tabellen 10 und 11 aufgelistet.

**Tab. 10: Bestandteile eines 10%igen SDS-Gels.**

Reagenz	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
ddH <sub>2</sub> O	1,9	1,4
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (Roth <sup>®</sup> )	1,7	0,33
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3	
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		0,25
10%ige SDS-Lösung (Roth <sup>®</sup> )	0,05	0,02
10%iges Ammoniumpersulfat (APS, Roth <sup>®</sup> )	0,05	0,02
TEMED (Roth <sup>®</sup> )	0,002	0,002
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>5,0</b>	<b>2,0</b>

**Tab. 11: Bestandteile eines 15%igen Harnstoffgels.**

Reagenz	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,1	
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		0,18
ddH <sub>2</sub> O	1,8	3,4
10%ige SDS-Lösung (Roth <sup>®</sup> )	0,125	0,045
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel A (Roth <sup>®</sup> )	6,7	0,75
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel B (Roth <sup>®</sup> )	0,675	0,075
Harnstoff (Merck <sup>®</sup> )	4,5 g	
Substanzen werden bei 30°C unter Schütteln (150 rpm) erwärmt und bei RT abgekühlt		
10%iges Ammoniumpersulfat (APS, Roth <sup>®</sup> )	0,0625	0,0225
TEMED (Roth <sup>®</sup> )	0,004	0,0045
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>12,46</b>	<b>4,48</b>

Die bei -80°C gelagerten Zellextrakte wurden bei RT aufgetaut und für 30 Sek. bei 18000 rcf zentrifugiert. Es erfolgte das Auftragen des Überstands (10 oder 15 µl) auf die SDS- bzw. Harnstoffgele. Die Proteintrennung erfolgte unter Verwendung des Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell Systems (Bio-Rad<sup>®</sup>, Hercules, Kalifornien, USA) für die SDS-Gele. Bei den Harnstoffgelen wurde eine Sonderanfertigung (Mechanik NW1 Universität Bayreuth, Deutschland) eingesetzt. Bei beiden Separierungsmethoden wurde ein SDS-PAGE-Laufpuffer (1% SDS, 25 mM Tris, 192 mM Glycin) bei folgenden experimentellen Bedingungen gebraucht: 10 bis 15 mA für ca. 60 Min. bei den SDS-Gelen und 20 bis 30 mA für ca. 60 Min. bei den Harnstoffgelen.

Der Transfer der getrennten Proteine erfolgte beim Western Blot mit Hilfe des Tank-Blot- oder des Semidry-Blot-Verfahrens auf eine PVDF-Membran (Immuno-Blot<sup>®</sup> PVDF Membrane For Protein Blotting von Bio-Rad<sup>®</sup>, Porengröße 0,2 µm). Für das erste System wurde der Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell (Bio-Rad<sup>®</sup>) Apparat verwendet. Das Gel wurde zusammen mit zwei Fiberglaspolstern, zwei Bögen Filterpapier (Whatman<sup>™</sup>, GE Healthcare, Little Chalfont, GB) und der PVDF Membran in eine Gelhalterkassette eingespannt. Nach dem Einsetzen der Kassette in das Elektrodenmodul erfolgte das Überführen in den Tank. Der Behälter enthielt ein Kühlelement und wurde mit 4°C kaltem Transferpuffer (12,5 mM Tris,

96 mM Glycin und 10% Methanol) befüllt. Es erfolgte die Proteinübertragung bei 175 mA für 60 Min. Bei der Semidry Methode wurde das Harnstoffgel, die PVDF-Membran und das Filterpapier mit gekühltem Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol) befeuchtet. Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran mit drei Lagen Filterpapier aufgelegt und mit drei weiteren Bögen Filterpapier bedeckt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine bei 150 mA für 75 Min.

Im Anschluss an den Proteintransfer erfolgte die Färbung der Membran mit Ponceau S Lösung (0,5% Ponceau S, 1% Essigsäure). Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden die unspezifischen Markierungen mit einer Entfärbelösung (10% Essigsäure, 40% Ethanol) beseitigt und die Membran dokumentiert. Die vollständige Entfärbung erfolgte mit TBS-T (49,9 mM Tris, 146 mM NaCl, 0,5% Tween 20, pH 7,5) und die Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen mittels einer 5%igen Milchpufferlösung (5% fettarmes Milchpulver (Roth®) in TBS-T). Im Anschluss an eine einstündige Inkubation wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (in Milchpuffer gelöst) für 1 - 4 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C behandelt. Der Blot wurde, nach einem dreimaligen Waschschrift in TBS-T (je 10 Min.), für max. 4 Std. mit dem zweiten Antikörper (in Milchpuffer gelöst) überschichtet. Die verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Die Detektion der Proteine erfolgte nachdem die Membran erneut dreimal in TBS-T gewaschen wurde.

**Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete Erst- und Zweitantikörper.**

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Quelle
Anti-GFP ab6556	Hase, polyklonal	1:3000	Abcam®, Cambridge, GB
Anti-GFP ab32146	Hase, monoklonal	1:10000	Abcam®
Anti-HA	Ratte, monoklonal	1:200	unbekannt
Anti-Hexokinase	Hase, polyklonal	1:15000	Biotrend Biochemikalien GmbH (Köln, Deutschland)
Anti-TDP-43 ab41881	Hase, polyklonal	1:2000	Abcam®
Anti-Hase IgG HRP	Ziege	1:10000	Promega
Anti-Ratte IgG HRP	Ziege	1:25000	Sigma-Aldrich®

Die immunologische Analyse des Blots erfolgt am ImageQuant™ LAS (GE Healthcare) unter Verwendung von selbsthergestellter Luminollösung. Diese setzte sich aus 2 ml Lösung 1 (100 mM Tris, 1,4 mM Luminol (Roth®)), 800 µl Lösung 2 (1,1% Coumarinsäure (Sigma®))

in DMSO) und 2,2 ml ddH<sub>2</sub>O zusammen. Die Aktivierung des Gemisches erfolgte kurz vor Gebrauch mit 2,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Im Bedarfsfall, zur Verstärkung der Signale, wurde bis zu 100 µl industriell hergestellte Luminollösung der eigenen Suspension beigemischt. Die käuflich erworbene Lumigen TMA-6<sup>®</sup> (Lumigen Inc., Southfield, Michigan, USA) Lösung setzte sich aus Lösung A und B zusammen und wurde 1:1 zum Gebrauch vermengt. Es erfolgten die Inkubation der Membran mit der Luminollösung für 1 bis 2 Min. und die Detektion am LAS4000 Gerät, welches mit einer Fujifilm™ CCD Kamera ausgestattet war. Bei der datenverarbeitenden Software handelte es sich um den Image Reader LAS. Die experimentellen Einstellungen waren: Chemilumineszenz, mit steigender Belichtungszeit und hoher Auflösung. Nach der immunologischen Untersuchung wurde die Membran im Bedarfsfall gestrippt. Dies war notwendig, um die gebundenen Antikörper zu zerstören und um weitere Proteine immunologisch zu detektieren. Die Membran wurde hierfür mit Stripping-Puffer (51 mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol) bei 50 bis 60°C für 15 Min. inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T konnte die Membran mit Blockierungslösung, erstem und zweiten Antikörper behandelt und die Proteine am LAS4000 detektiert werden.

Die Bearbeitung der digitalisierten Bilder mit der Adobe Photoshop CS5 Software erfolgte ausschließlich in Helligkeit, Kontrast und Tonwert.

Die Quantifizierung des Western Blots erfolgte mit ImageJ 1.46r. Die Peakfläche des immunologischen Signals für das Protein von Interesse wurde unter Abzug des Hintergrunds bestimmt. Die Signalintensität wurde auf die Peakfläche der Ladekontrolle Hexokinase normalisiert.

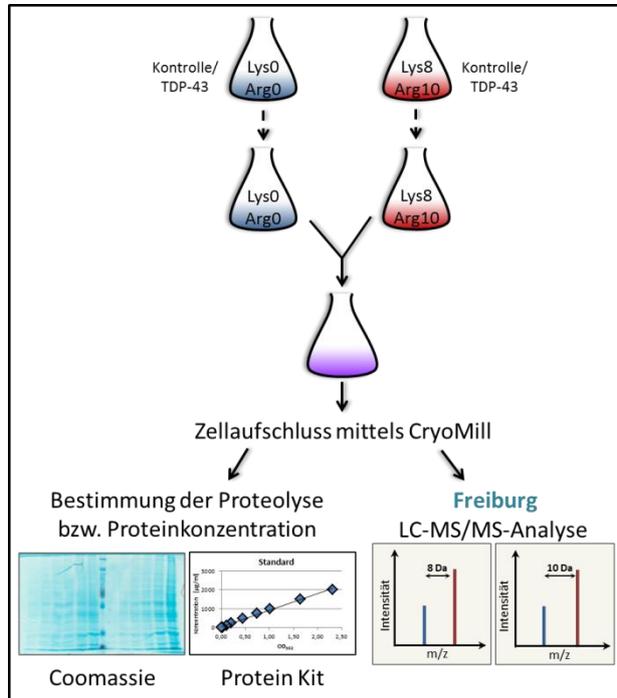
### 3.13 Quantitative Proteomanalyse (SILAC-Analyse)

Die massenspektrometrische nichtradioaktive SILAC- (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) Methode bietet eine hervorragende Möglichkeit, Veränderungen in der Proteinexpression quantitativ zu untersuchen. Mit Hilfe isotopenmarkierter Aminosäuren können Proteine differenziert und mengenmäßig, bei unterschiedlichen Bedingungen, analysiert werden (Ong *et al.* 2002).

In dieser Arbeit wurden Kulturen mit normalen bzw. schweren Aminosäuren miteinander verglichen, die einerseits das Kontrollplasmid, andererseits das TDP-43-Konstrukt enthielten. Die Anzucht der Hefen erfolgte über mehrere Tage in SCD-His Medium. Anschließend erfolgte die Überführung für 20 Std. in Expressionsmedium (siehe Abschnitt 3.5.7). Nach der Expression von TDP-43 wurden die Kulturen zu gleichen Teilen vermischt, mehrfach

gewaschen, zu länglichen dünnen Hefepellets verarbeitet und mit Hilfe der CryoMill (Retsch, Haan, Deutschland) aufgeschlossen. Auf Grund des Aminosäureaustausches (normale gegen schwere Aminosäuren und umgekehrt) in den Nährmedien lagen zwei biologische Replikate vor (Mischkultur 1 und 2). So bestand z. B. die Mischkultur 1 aus wt-Zellen, die das Kontrollplasmid enthielten und in Medium mit leichten Aminosäuren inkubiert worden waren. Ferner beinhaltete die Mischkultur 1 wildtypische Zellen, die TDP-43 exprimierten und in Medium mit schweren Aminosäuren kultiviert worden waren. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific<sup>™</sup>). Des Weiteren wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und mit einer Coomassie-Färbung behandelt, um eine Proteolyse auszuschließen. Die aufgeschlossenen Hefen wurden anschließend zur massenspektrometrischen Analyse nach Freiburg in die *Core Facility Proteomics* versendet. Eine graphische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in der Abb. 9 dargestellt.

Die Herstellung der langen und dünnen Hefepellets erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS und diente der Oberflächenvergrößerung und dem optimalen Aufschluss des Zellpellets mit der CryoMill. Die gereinigten, in 5 ml 1x PBS gelösten Zellen wurden in einer



**Abb. 9: Graphische Darstellung des SILAC-Experiments.** Die mit einem Kontroll- bzw. TDP-43-codierenden Plasmid transformierten Zellen wurden in SCD-His Flüssigmedium über mehrere Tage angezogen. Das Medium enthielt entweder die leichten (blaue Lösung) oder die schweren (rote Lösung) Aminosäuren Arginin und Lysin. Deren umfassende Integration in die neu synthetisierten Zellproteine sollte durch die mehrtägige Inkubation sichergestellt werden. Nachdem die Zellen durch die Zugabe von frischem Medium in die logarithmische Phase überführt waren, wurden sie mit SCDGal-His Expressionsmedium vermischt und für 20 Std. kultiviert. In Abhängigkeit ihrer  $OD_{600}$  erfolgte das Vermengen der Kulturen, die entweder ein Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid enthielten, im Verhältnis 1:1. Mit Hilfe der CryoMill wurden die Zellen aufgeschlossen

und die Proteinmenge in Bayreuth durch das Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit bestimmt. Darüber hinaus wurde mittels der Coomassie-Färbung eine Proteolyse ausgeschlossen. Ein weiterer Teil der Proben wurde nach Freiburg zur LC-MS/MS Analyse versendet.

15 ml Spritze pelletiert. Hierfür wurde der Kolben aus der Spritze entfernt, die Düse mit einem Stopfen verschlossen und die Suspension für 5 Min. bei 4°C und 2000 rcf zentrifugiert.

Nachdem der Überstand verworfen war, erfolgte die Überführung des Pellets in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes 50 ml Reaktionsgefäß. Die langgezogenen dünnen Hefefäden wurden in der stickstoffgekühlten CryoMill mittels Metallkugeln zu Hefepulver zermahlen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der massenspektrometrischen Analyse wurden 100 mg des Pulvers entnommen und auf Eis mit 200  $\mu\text{l}$  frischem RIPA-Puffer (*radioimmunoprecipitation assay*) vermengt. Der Puffer bestand aus 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA, 5 mM Chloracetamid, 2 mM PMSF, einer Proteaseinhibitorcocktailtablette (cOmplete™ Mini EDTA-frei, Roche, Mannheim, Deutschland) und einer Phosphataseinhibitor-tablette (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA-frei, Thermo Scientific™). Das Gemisch wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Min. auf einem Drehrad (Stuart® SB 3 Rotators, VWR International) inkubiert und für 10 Min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 9168 rcf zentrifugiert. Es erfolgten die Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ein Teil des Gemisches wurde zur Analyse mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit und zur Coomassie-Färbung verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Absorption des Standards und der Proben wurde mit Hilfe des Mikroplatten-Readers bei 562 nm detektiert.

Bei der Coomassie-Färbung wurden 20  $\mu\text{l}$  der in RIPA-gelösten Proteinsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  2x SDS-Probenpuffer vermengt und eine Verdünnungsreihe erstellt (Konzentration: 2,5  $\mu\text{g}$  - 100  $\mu\text{g}$ ). Nach dem Auftrag der verdünnten Proben, erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 5 mA für ca. 60 Min. Das SDS-Gel wurde nach dem Protokoll von Braun *et al.* (2009) mit kolloidalem Coomassie behandelt. Als erstes erfolgte eine zweimalige Inkubation mit einer kolloidalen Coomassie-Fixierlösung (20% Methanol, 10% Phosphorsäure) für jeweils 15 Min. Nach einer dreimaligen Behandlung mit 10%iger Phosphorsäure (jeweils 10 Min.) wurde das Gel einmal für 15 Min. mit kolloidaler Coomassie-Äquilibriumslösung (20% Methanol, 10% Phosphorsäure, 10% Ammoniumsulfat) überschichtet. Die Markierung der Proteinbanden erfolgte mit einer 1,2%igen Coomassie G-250 Färbelösung. Anschließend wurde das Gel digitalisiert.

### 3.14 Statistik

Die statistische Auswertung zweier Gruppen erfolgte bei fast allen Experimenten durch einen ungepaarten zweiseitigen Student'schen t-Test. Die einzige Ausnahme stellte die GFP-Atg8-Prozessierung dar. Hier erfolgte die Auswertung mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung von Modulatoren der TDP-43-induzierten Zytotoxizität

#### 4.1.1 Allgemeines zum TDP-43-Tüpfeltestscreen

Die Eliminierung neurotoxischer Proteine, wie TDP-43, über potenzielle zelluläre Abbauwege ist für die Zelle überlebenswichtig. Ferner ist der zugrundeliegende Prozess für das Krankheitsverständnis unerlässlich. Die konkrete Beteiligung des UPS und der vakuolären Abbauwege, zu denen der endosomale Transport (bestehend aus früher Endozytose und MVB-Weg) und die Autophagie gehören, ist bei der Beseitigung von TDP-43 in der Fachwelt umstritten (Scotter *et al.* 2014, Huang *et al.* 2014). Darüber hinaus liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur Stoffwechselprozesse durch die TDP-43-Expression beeinflusst werden, sondern auch verschiedene Zellorganellen auf die Anwesenheit von TDP-43 reagieren. So konnten u. a. geschädigte und in ihrer Morphologie veränderte Mitochondrien in ALS-Patienten und in Tiermodellen nachgewiesen werden (Chung und Suh 2002, Natale *et al.* 2015). Im Falle einer mitochondrialen Beeinträchtigung ist die Zelle in der Lage einen intrazellulären Signalweg zu induzieren. Die sogenannte retrograde Stressantwort aktiviert Transkriptionsfaktoren und ist mit weiteren zellulären Prozessen, wie der Apoptose und der Autophagie verknüpft (Jazwinski und Kriete 2012, Ždralović *et al.* 2012). Neben den Mitochondrien sind die Peroxisomen an mehreren metabolischen Prozessen (z. B. Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel) und Entgiftungsreaktionen beteiligt (Tam *et al.* 2003, Sibirny 2016).

Um die molekularbiologischen Mechanismen und die dafür benötigten Organellen zur Auflösung von fehllokalisiertem, aggregiertem TDP-43 in der Zelle zu verstehen, wurde eine Auswahl an Deletionsstämmen mit einem Plasmid, welches für das humane TDP-43 codierte (pCM190), transformiert und systematisch mittels Tüpfeltests (semiquantitative Messung von Wachstumsdefiziten auf Agarplatten, siehe unten) untersucht. Unter den deletierten Stämmen befanden sich Abbaukomponenten, Stoffwechselmodulatoren und -regulatoren.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag hierbei auf der Analyse verschiedener Qualitätskontrollmechanismen, besonders auf der der Autophagie. Des Weiteren wurden der endosomal-vakuoläre Transportweg sowie die Vakuolenmaschinerie, die sowohl für die Endozytose als auch für die Autophagie benötigt wird, analysiert. Um den Einfluss von TDP-43 auf die unterschiedlichen Zellkompartimente und der von ihnen induzierten Stressreaktionen zu untersuchen, wurden geeignete Deletionsstämme genutzt. Diesen

Stämmen fehlten Peroxisomen- oder Mitochondrien-assoziiertes Gene bzw. Gene für die *retrograde response*. Neben den Genen, die sich eindeutig zuordnen lassen, wie *ATG1* (*AuTophagy related*, beteiligt an der Autophagie) und *VPS27* (*Vacuolar Protein Sorting*, ESCRT-Komponente), existieren in der Zelle Proteine mit multifunktionalen Aufgaben. Zu diesen gehören u. a. Pho85 und TORC1 (*Target Of Rapamycin Complex 1*). Letzteres ist an der Autophagie, an der Endozytose, am Zellwachstum und am Zellzyklus beteiligt (Loewith und Hall 2011, MacGurn *et al.* 2011, Dobzinski *et al.* 2015). Die Proteinkinase Pho85 reguliert neben dem Zellzyklus, die Morphogenese und die Autophagie (Carroll und O'Shea 2002, Huang *et al.* 2007, Yang *et al.* 2010). Alle im TDP-43-Tüpfeltestscreen untersuchten Deletionsstämme wurden mit einem Kontroll- bzw. TDP-43-Plasmid transformiert. Ziel war es die pathophysiologischen Auswirkungen der TDP-43-Expression auf das Zellwachstum zu untersuchen.

In diesem Screen wurde das pCM190 Kontroll- oder TDP-43-codierende Plasmid in die ausgewählten Deletionsstämme transformiert. Der Vorteil des pCM Konstrukts gegenüber anderen Vektoren ist der TetOff Promotor. Die Expression von TDP-43 erfolgt ausschließlich bei der Kultivierung der Stämme auf Doxycyclin-freiem Medium (Gari *et al.* 1997). Dies ermöglicht die Untersuchung der TDP-43-Zytotoxizität ohne den Austausch der Kohlenstoffquelle. Der Wechsel von z. B. Glukose auf Galaktose hätte den Nachteil, dass sich das Zellwachstum auf den Kontroll- und auf den Expressionsplatten erheblich unterscheidet. Dieses Defizit kann mit Hilfe des pCM Konstrukts umgangen werden.

Der Tüpfeltestscreen stellt eine hervorragende Möglichkeit dar, eine Vielzahl von Deletionsstämmen phänotypisch zu charakterisieren. Die Analysemethode erlaubt den quantitativen Vergleich des Zellwachstums von wildtypischen und mutierten Stämmen bei der Expression neurotoxischer Proteinen wie TDP-43. Bereits vorherige Studien konnten zeigen, dass die Expression von TDP-43 die Vitalität der Zellen im Tüpfeltest negativ beeinflusst (Johnson *et al.* 2008 und 2009, Elden *et al.* 2010, Braun *et al.* 2011, Armakola *et al.* 2012).

Die zytotoxischen Auswirkungen der TDP-43-Expression auf die Deletionsstämme wurden nach drei bzw. sechs Tagen Inkubation dokumentiert und das Zellwachstum quantifiziert (siehe Abschnitt 3.7 und 3.8). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Wachstumsindex. Bei diesem wird das wildtypische Wuchsverhalten mit dem des Mutationsstamms verglichen (siehe Abschnitt 3.9). Die insgesamt 109 (nach drei Tagen) bzw. 105 (nach sechs Tagen) untersuchten Deletionsstämme wurden in 11 Hauptgruppen eingeteilt (siehe Tab. 13). Sie enthielten Stämme, denen Gene für *ATG*-Kernkomponenten fehlten, welche für die Ausbildung des Autophagosoms erforderlich sind (Inoue und Klionsky 2010), Gene für die

selektive Autophagie oder weitere für die Autophagie relevante Gene. Ferner wurden Stämme analysiert, deren deletierte Gene für das UPS oder die *retrograde response* gebraucht werden bzw. deren Expressionsprodukte in den Mitochondrien oder Peroxisomen lokalisiert sind. Die letzten vier Fraktionen enthielten Stämme, denen Gene fehlten, welche für die Endozytose, für die Bildung der ESCRT- (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) Komplexe oder für die vakuoläre Fusion benötigt werden bzw. die keiner der aufgezählten Gruppen eindeutig oder alleinig zugeordnet werden konnten. Die selektive Autophagie wurde zusätzlich in drei Untergruppen gegliedert: die Mitophagie, die Pexophagie und der Cvt-Transportweg (*Cytoplasm-to-Vacuole Targeting*). Einige ATG-Gene konnten mehreren dieser Teilfraktionen zugeordnet werden. Ein Beispiel ist *ATG11*. Das Protein wird in allen drei untersuchten selektiven Autophagiewegen benötigt und zählt zugleich zu den in der unspezifischen Autophagie benötigten Proteinen. Des Weiteren wurden vier Stämme (*Δatg11*, *Δrpn4*, *Δubi4* und *Δgat1*) nach sechs Tagen nicht dokumentiert und ausgewertet. All diese Stämme wurden in der Tabelle farbig gekennzeichnet (siehe Tab. 13). Drei der 11 Hauptgruppen (Stämme, denen Gene für die Autophagosomenausbildung, ESCRT- und Vakuolenfusionsgene fehlten) wurde in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung beigemessen und aus diesem Grund mit Farbe hervorgehoben (siehe Tab. 13). Die Untersuchung der Deletionsstämme erfolgte zumeist einmal. Einige Stämme, wie *Δatg1*, *Δvam3*, *Δvps24*, *Δvps25* und *Δvps27*, wurden auf Grund ihres signifikanten Effekts und ihrer Relevanz für die TDP-43-Eliminierung mehrfach untersucht und der Wachstumsindex (siehe Abschnitt 3.9) aller Durchgänge gemittelt. Die Stämme mit ihren exakten Wachstumsindizes für die Tage drei und sechs sind in den Tab. I und II im Anhang aufgelistet. Die durch die Expression von TDP-43 bedingte Wachstumsveränderung der 109 bzw. 105 Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp ist graphisch in der Abb. 10 aufgeführt.

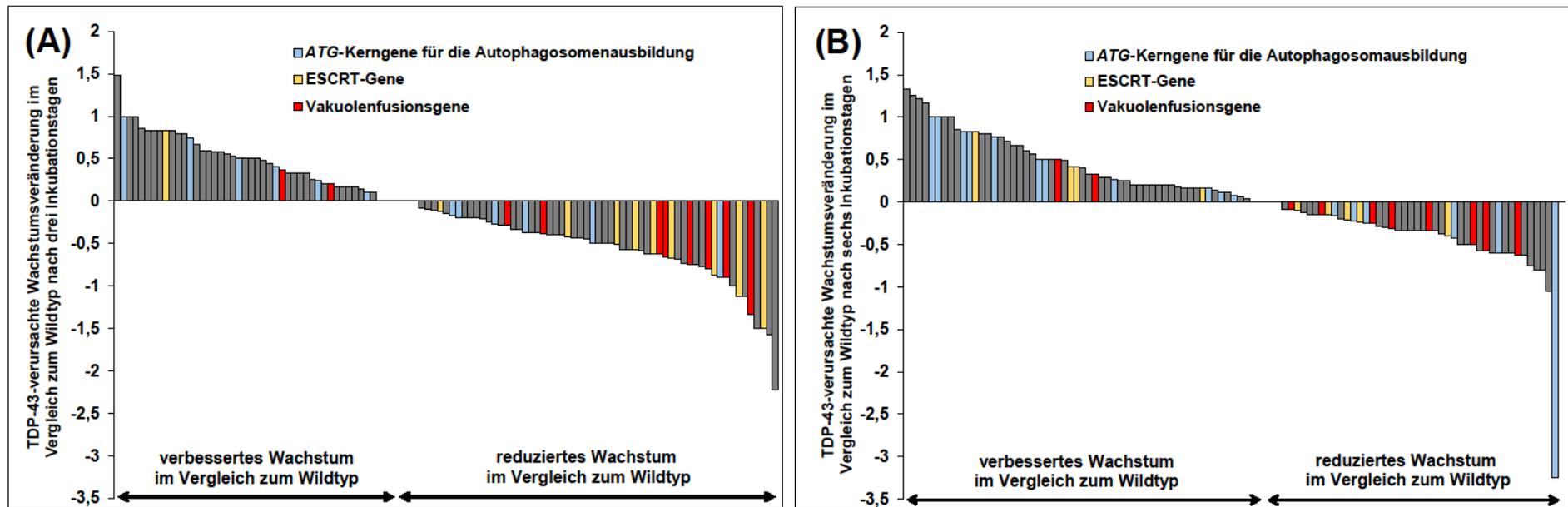
Allgemein konnte festgestellt werden, dass nach drei Tagen Inkubation 42 Deletionsstämme (38,5%) ein verbessertes, 60 Stämme (55%) ein verschlechtertes und sieben Mutationsstämme (6,4%) ein ähnliches Wachstum zum TDP-43-exprimierenden Wildtypstamm aufwiesen. Nach sechs Tagen Kultivierung war die Fraktion der deletierten Stämme mit gesteigertem Zellwuchs erhöht. So konnten bei 56 Stämmen (53,3%) ein verstärktes Wachstum gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden. 44 Stämme (41,9%) zeigten ein vermindertes und fünf Stämme (4,8%) ein gleiches Wuchsverhalten wie der wt-Stamm während der Expression von TDP-43.

Als nächstes sollen die Auswirkungen einer Deletion in Organellen-assoziierten Qualitätsprozessen auf die TDP-43-bedingte Zytotoxizität näher betrachtet werden.

**Tab. 13: Überblick über die analysierten Deletionsstämme.** 109 Deletionsstämme wurden gemäß der Funktion des deletierten Gens in eine von insgesamt 11 Hauptgruppen eingeordnet. Die Gruppe der selektiven Autophagiegene wurde in drei Fraktionen (Cvt-Transportweg, Mitophagie und Pexophagie (v. o. n. u., abgegrenzt durch einen dunklen Strich)) strukturiert. Die farbig gekennzeichneten Gene konnten entweder mehreren Gruppen zugeordnet (**lila**) und/oder nicht nach sechs Tagen dokumentiert (**grün**) werden. Die Gene in den hervorgehobenen Hauptgruppen (Kerngene für die Autophagosomenausbildung, ESCRT- und Vakuolenfusionsgene) waren für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung (siehe Text).

Kerngene für die Autophagosomenausbildung	Gene für die selektive Autophagie	weitere Autophagiegene	UPS	Endozytosegene	ESCRT-Gene	Vakuolenfusionsgene	mitochondriale Gene	Gene für die retrograde response	peroxisomale Gene und Transkriptionsfaktoren	weitere Gene
<i>ATG1</i>	<i>ATG11</i>	<i>AIM26</i>	<i>RPN4</i>	<i>ARK1</i>	<i>DOA4</i>	<i>CCZ1</i>	<i>CIS1</i>	<i>BMH1</i>	<i>ADR1</i>	<i>ACS1</i>
<i>ATG2</i>	<i>ATG19</i>	<i>ATG11</i>	<i>UBI4</i>	<i>EDE1</i>	<i>VPS2</i>	<i>MON1</i>	<i>FMC1</i>	<i>BMH2</i>	<i>OAF1</i>	<i>ATG26</i>
<i>ATG3</i>	<i>ATG20</i>	<i>ATG17</i>		<i>END3</i>	<i>VPS4</i>	<i>NHX1</i>	<i>GEM1</i>	<i>CIT2</i>	<i>PEX3</i>	<i>GAT1</i>
<i>ATG5</i>	<i>ATG21</i>	<i>ATG23</i>		<i>ENT1</i>	<i>VPS22</i>	<i>VAM3</i>	<i>MDM38</i>	<i>DLD3</i>	<i>PEX11</i>	<i>HOG1</i>
<i>ATG6</i>	<i>ATG23</i>	<i>ATG27</i>		<i>NPR1</i>	<i>VPS23</i>	<i>VAM6</i>	<i>MPC1</i>	<i>RTG3</i>	<i>PEX13</i>	<i>PHO85</i>
<i>ATG7</i>	<i>ATG24</i>	<i>ATG29</i>		<i>SLA1</i>	<i>VPS24</i>	<i>VAM7</i>	<i>MPC2</i>		<i>PEX14</i>	<i>SPE1</i>
<i>ATG8</i>	<i>ATG27</i>	<i>ATG31</i>		<i>VPS21</i>	<i>VPS25</i>	<i>VPS33</i>	<i>MPC3</i>		<i>PEX25</i>	<i>TCO89</i>
<i>ATG9</i>	<i>ATG34</i>	<i>ATG41</i>			<i>VPS27</i>	<i>VPS41</i>	<i>POR1</i>		<i>PEX27</i>	<i>TOR1</i>
<i>ATG10</i>	<i>SNX4</i>	<i>PEP4</i>			<i>VPS28</i>	<i>YBT1</i>	<i>POR2</i>		<i>PIP2</i>	<i>WHI2</i>
<i>ATG12</i>	<i>AIM26</i>	<i>SIR2</i>			<i>VPS60</i>	<i>YPT7</i>	<i>UTH1</i>		<i>YLL054C</i>	<i>YOR019W</i>
<i>ATG13</i>	<i>ATG11</i>				<i>VTA1</i>					
<i>ATG14</i>	<i>ATG32</i>									
<i>ATG15</i>	<i>ATG33</i>									
<i>ATG16</i>	<i>MDM10</i>									
<i>ATG18</i>	<i>MDM12</i>									
<i>ATG22</i>	<i>MDM34</i>									

<b>Gene für die selektive Autophagie</b>
<i>MMM1</i>
<i>PBS2</i>
<i>PTC6</i>
<i>SIR2</i>
<i>SLG1</i>
<i>SLT2</i>
<i>YIL165C</i>
<i>ATG11</i>
<i>ATG36</i>
<i>SLT2</i>



**Abb. 10: Überblick der durch TDP-43-Expression verursachten Wachstumsveränderung (A) in 109 (nach drei Tagen Inkubation) bzw. (B) 105 (nach sechs Tagen Inkubation) Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp.** Die TDP-43-exprimierenden Deletionsstämmen deren Wachstumsindex unter 0,00 lag wuchsen schlechter als der zum Vergleich herangezogene TDP-43-exprimierende Wildtypstamm. Die deletierten Stämme, die TDP-43 synthetisierten und einen Wachstumsindex über 0,00 aufwiesen, wuchsen besser, als der zum Vergleich herangezogene TDP-43-exprimierende Referenzstamm. Die Deletionsstämmen, denen Gene fehlen, die physiologisch für die Autophagosomenausbildung, für die ESCRT-Komplexe oder für die vakuoläre Fusion benötigt werden, wurden farbig hervorgehoben. Die Deletionsstämmen mit ihren exakten Wachstumsindizes sind im Anhang Tab. I und II aufgeführt.

#### 4.1.2 Modifizierung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität in Peroxisomen- und Mitochondrien-assoziierten Deletionsstämmen und in Stämmen für die retrograde Stressantwort

Von den 109 ausgewerteten Deletionsstämmen fehlten bei 10 ein Mitochondrien-assoziiertes Gen. Es handelte sich hierbei um Gene, deren Expressionsprodukt in der äußeren oder der inneren Mitochondrienmembran bzw. in der Matrix lokalisiert ist. Zu den Aufgaben der funktionellen Proteine gehören u. a. der Austausch von Ionen und Stoffwechselprodukten, die zelluläre Stressantwort oder die Induktion der Mitophagie (Bandara *et al.* 1998, Kissová *et al.* 2004, Frazier *et al.* 2006, Herzig *et al.* 2012). Nach drei Tagen Inkubation konnte bei sieben Stämmen (70%) ein verbessertes und bei drei (30%) ein vermindertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp bei der Expression von TDP-43 festgestellt werden (siehe Anhang Abb. III). Nach sechs Tagen zeigten 50% der Mutanten ein verbessertes und 50% ein verschlechtertes Wachstum. Auf Grund dieser Datenlage, sollten weitere Kandidaten untersucht werden, um die Rolle der mitochondrialen Prozesse bei der TDP-43-bedingten Zytotoxizität aufzuklären.

Die TDP-43 Fehllokalisation und Aggregation könnte zu einer mitochondrialen Schädigung führen. Aus diesem Grund wurden fünf Deletionsstämme untersucht, denen Gene der *retrograden response* fehlten. Die Expressionsprodukte dienen als Transkriptionsfaktoren und Stoffwechsellenzyme, deren Eigenschaften in mehreren zellulären Prozessen benötigt werden. So sind die Proteine Bmh1 und Bmh2 nicht nur an der mitochondrialen Stressantwort beteiligt, sondern werden auch für den Vesikeltransport rekrutiert (Gelperin *et al.* 1995). Drei der untersuchten Deletionsstämme (60%) zeigten nach drei Tagen ein verbessertes und zwei (40%) ein reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (siehe Anhang Abb. IV). Nach sechs Tagen hatten nur noch zwei Stämme ein gesteigertes Wachstum. Drei Deletionsstämme besaßen gegenüber dem Referenzstamm einen verminderten Wuchs. Anhand dieser Ergebnisse kann keine eindeutig schädliche oder protektive Wirkung der *retrograden response* auf die TDP-43-bedingte Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Unabhängig von den Mitochondrien stellen die Peroxisomen ein bedeutendes, an vielen Funktionen beteiligtes, Zellorganell dar. Es wurden 10 Deletionsstämme untersucht, denen peroxisomale Gene und Transkriptionsfaktoren fehlten. Die überwiegende Anzahl der Expressionsprodukte ist in der Peroxisomenmembran lokalisiert und trägt zur Proteinstabilisierung, peroxisomalen Proliferation, Teilung und Vererbung bei (Höhfeld *et al.* 1991, Marshall *et al.* 1995, Smith *et al.* 2002). Ferner wurden Proteine, wie Oaf1, untersucht die die Transkription der Peroxisomengene fördern (Karpichev und Small 1998). Nach drei Kultivierungstagen hatten acht der 10 Stämme (80%) einen negativen und nur zwei (20%)

einen leicht positiven Wachstumsindex (siehe Anhang Abb. V). Bei sechs Tagen Inkubation hatten immerhin noch 50% der Deletionsstämme ein reduziertes, 40% der Stämme ein verbessertes und 10% ein ähnliches Wachstum im Verhältnis zum Wildtyp. Eine Störung der peroxisomalen Biogenese hat besonders am Beginn der Zellkultivierung einen verstärkenden Effekt auf die Zytotoxizität von TDP-43. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass funktionelle Peroxisomen für die Detoxifizierung von TDP-43 in der Zelle benötigt werden.

#### 4.1.3 Wachstumsanalyse von Stämmen mit einem deletierten multifunktionalen Gen in der Gegenwart von TDP-43

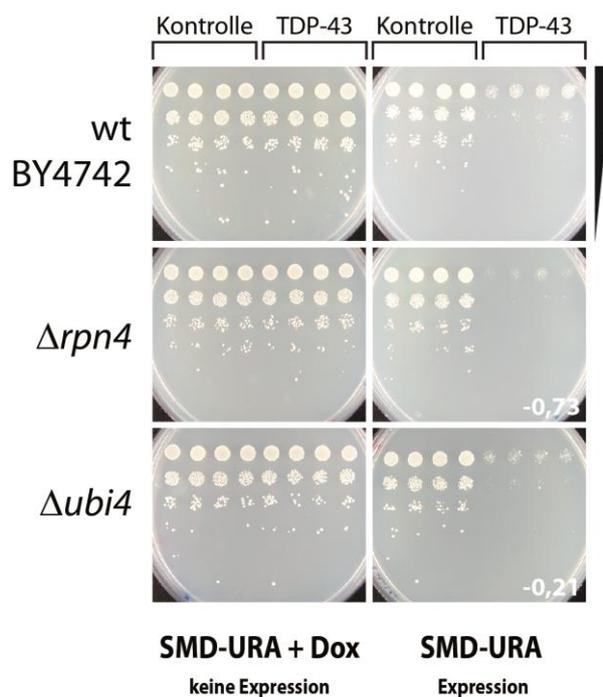
Die Hauptgruppe „weitere Gene“ bestand aus 10 Deletionsstämmen. Die in diesen Stämmen fehlenden Gene codieren multifunktionale Proteine, die in vorhergehenden TDP-43-Screens aufgetreten sind oder eine noch unbekannt Funktion besaßen. Von den untersuchten Stämmen waren nach drei Tagen Inkubation sechs (60%) protektiv und vier (40%) TDP-43-Toxizität steigernd (siehe Anhang Abb. VI). Zur letzteren Gruppe gehörte der  $\Delta pho85$ -Stamm. Dieser Deletionsstamm besaß mit -2,23 den niedrigsten Wachstumsindex von allen 109 analysierten Stämmen. Die Komponenten des TORC 1, Tor1 und Tco89, besaßen ebenso negative Werte. Auf der anderen Seite führte die Deletion von *HOG1* zu einem stark verbesserten Wachstum (1,00). Nach sechs Tagen Kultivierung konnten nur noch neun Stämme ausgewertet werden. Erneut zeigten sechs Deletionsstämme (66,6%) ein verbessertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp. Drei (33,3%) wuchsen schlechter. Hog1 gehörte zu den Stämmen mit dem höchsten Wachstumsindex (1,22). Bei diesem Protein handelt es sich um eine Kinase, welche die Zellteilung fördert und an der Osmoregulation und der Mitophagie beteiligt ist (Brewster *et al.* 1993, Mao *et al.* 2011). Das Ausschalten von Pho85, Tor1 und Tco89 forcierte die TDP-43-bedingte Zytotoxizität. Alle drei Proteine werden bei zahlreichen zellulären Prozessen benötigt, einer davon ist die Autophagie (Kamada *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001). Diese Daten suggerieren eine mögliche Beteiligung der selektiven oder nichtselektiven Autophagie bei der Modulierung der Zytotoxizität von TDP-43 (siehe unten).

#### 4.1.4 TDP-43-bedingte Zytotoxizität in Stämmen mit einem deletierten Proteinqualitätskontrollgen

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist eines von mehreren Mechanismen der qualitativen Proteinkontrolle. Getestet wurden zwei Deletionsstämme, denen entweder *RPN4* oder *UBI4* fehlten. *RPN4* codiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher durch seine DNA-Bindungsfähigkeit Gene reguliert, deren Expressionsprodukte als Komponenten des

Proteasoms dienen (Finley *et al.* 2012). *UBI4* codiert für Stress-reguliertes Ubiquitin, welches an Proteine konjugiert wird und damit die Proteine zum Abbau im Proteasom markiert (Ozkaynak *et al.* 1987). Beide Deletionsstämme,  $\Delta rpn4$  und  $\Delta ubi4$ , hatten nach drei Inkubationstagen ein verschlechtertes Wachstum (Abb. 11). Dieses trat bei  $\Delta rpn4$  deutlicher (-0,73) hervor als bei  $\Delta ubi4$  (-0,21). Der Wuchs nach sechs Tagen wurde nicht dokumentiert. Es ist möglich, dass das UPS eine protektive Rolle auf TDP-43-exprimierende Zellen hat, möglicherweise weil es am Abbau von TDP-43 beteiligt ist.

Die Autophagie ist ein zellulärer Abbauweg um überflüssige, geschädigte Organellen oder fehlgefaltete, toxische Proteine aus der Zelle zu entfernen (Bjørkøy *et al.* 2005, Reggiori und Klionsky 2013, Feng *et al.* 2014). Sie dient der Generierung neuer Stoffwechselbausteine, welche zum Aufbau neuer Strukturen benötigt werden. Die Autophagie gehört zu einem von mindestens sechs vakuolären Transportwegen (Mullins und Bonifacino 2001). Neben der



**Abb. 11: Die Expression von TDP-43 bedingt eine Wachstumsreduktion beim Wildtyp und den UPS Deletionsstämmen  $\Delta rpn4$  und  $\Delta ubi4$ .** Der Wildtyp und die Deletionsstämme wurden mit einem Doxycyclin-abhängigen Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert, auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) getüpfelt und für drei Tage inkubiert. Beide Deletionsstämme zeigten ein vermindertes Wachstum gegenüber dem wt und hatten negative Wachstumsindizes (-0,73 und -0,21).

Autophagie zählen die Endozytose, die Vererbung der Vakuolen bei der Zellteilung, der Cvt-Transportweg und zwei alternative biosynthetische Wege (Alkalische Phosphatase (ALP) und Carboxypeptidase Y (CPY)) zu dieser Gruppe. Der Cvt-Abbauweg kann auch bei der selektiven Autophagie eingeordnet werden, da einige, im Cvt-Weg verwendete, Atg Proteine an weiteren autophagischen Prozessen beteiligt sind. Auf Grund der anhaltenden Diskussion über die mögliche Beteiligung der Autophagie bei der Eliminierung von TDP-43, wurden schwerpunktmäßig 44 Deletionsstämme im TDP-43-Tüpfeltestscreen untersucht. Die in den Stämmen fehlenden Gene codierten sogenannte Atg-Kernproteine, die für die Bildung des Autophagosoms benötigt werden, Proteine für die selektive

Autophagie und weitere für die Autophagie relevante Proteine. Von den 44 analysierten

Stämmen zeigten nach drei Tagen Inkubation 21 Stämme (47,7%) ein verbessertes, 18 (41%) ein vermindertes und fünf (11,3%) ein ähnliches Wachstum wie der Referenzstamm. Nach sechs Kultivierungstagen wurden 43 Stämme untersucht. Von denen besaßen 28 Deletionsstämme (65,1%) einen erhöhten und 15 (34,9%) einen verminderten Wuchs.

Die *ATG*-Kernkomponenten werden für die Autophagosomenausbildung benötigt, welches zu den wichtigsten Ereignissen der Autophagie hinsichtlich des Verständnisses des Prozesses zählt (Inoue und Klionsky 2010). Aus diesem Grund hatten die 16 analysierten Deletionsstämme von allen Autophagie-relevanten Stämmen die höchste Priorität. Die Stämme zeigten eine relativ gleichmäßige Verteilung über das gesamte Wachstumsspektrum. So wurden nach drei Tagen sechs Stämme (37,5%) mit verbessertem, sechs (37,5%) mit reduziertem und vier (25%) mit gleichem Wachstum beobachtet (Abb. 12). Nach weiteren drei Tagen zeigten 10 Stämme (62,5%) ein erhöhtes und sechs (37,5%) ein vermindertes Wachstum. Der  $\Delta atg9$  Deletionsstamm war nach drei Inkubationstagen der Stamm mit dem zweithöchsten Wachstumsindex (1,00). Nach sechs Tagen besaß er noch einen Wert von 0,77.  $\Delta atg7$  zeigte an beiden analysierten Tagen ein stark reduziertes Wachstum (-0,90 bzw. -0,60). Der  $\Delta atg1$  Deletionsstamm hingegen schwankte leicht in Bezug auf seinen Wachstumsindex zwischen leicht negativ (-0,19 am dritten Tag) und leicht positiv (0,08 am sechsten Tag). Der Stamm wurde auf Grund seiner Relevanz beim Autophagieprozess für weitere Fragestellungen verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2, 4.3.1 und 4.3.2).

Im Allgemeinen konnte keine eindeutig protektive oder Toxizität-verstärkende Tendenz der 16 analysierten Stämme festgestellt werden. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Komponenten für die Bildung des Autophagosoms wahrscheinlich keinen wesentlichen Effekt auf die TDP-43-verursachte Zytotoxizität haben.

Unabhängig von den Genen, deren Expressionsprodukte generell für den autophagischen Prozess benötigt werden, existieren Gene für die selektive Autophagie (Cvt-Weg, Mitophagie, Pexophagie) (siehe Anhang Abb. VII). Diese codieren Proteine die speziell zum Transport und Abbau bestimmter Organellen, wie z. B. der Mitochondrien oder des ER, rekrutiert werden. Es wurden insgesamt 23 unterschiedliche Deletionsstämme analysiert, denen Gene für die selektive Autophagie fehlten. 14 dieser 23 Stämme wiesen eine Deletion in einem Mitophagie-relevanten Gen auf. Acht Deletionsstämme zeigten am dritten Inkubationstag einen positiven Wachstumsindex, sechs einen negativen. Am sechsten Tag wurden 13 Stämme untersucht, von diesen acht ein verbessertes und fünf ein verschlechtertes Wachstum gegenüber den wt-Stamm aufwiesen. Der  $\Delta slg1$ -Stamm war einer der auffälligsten

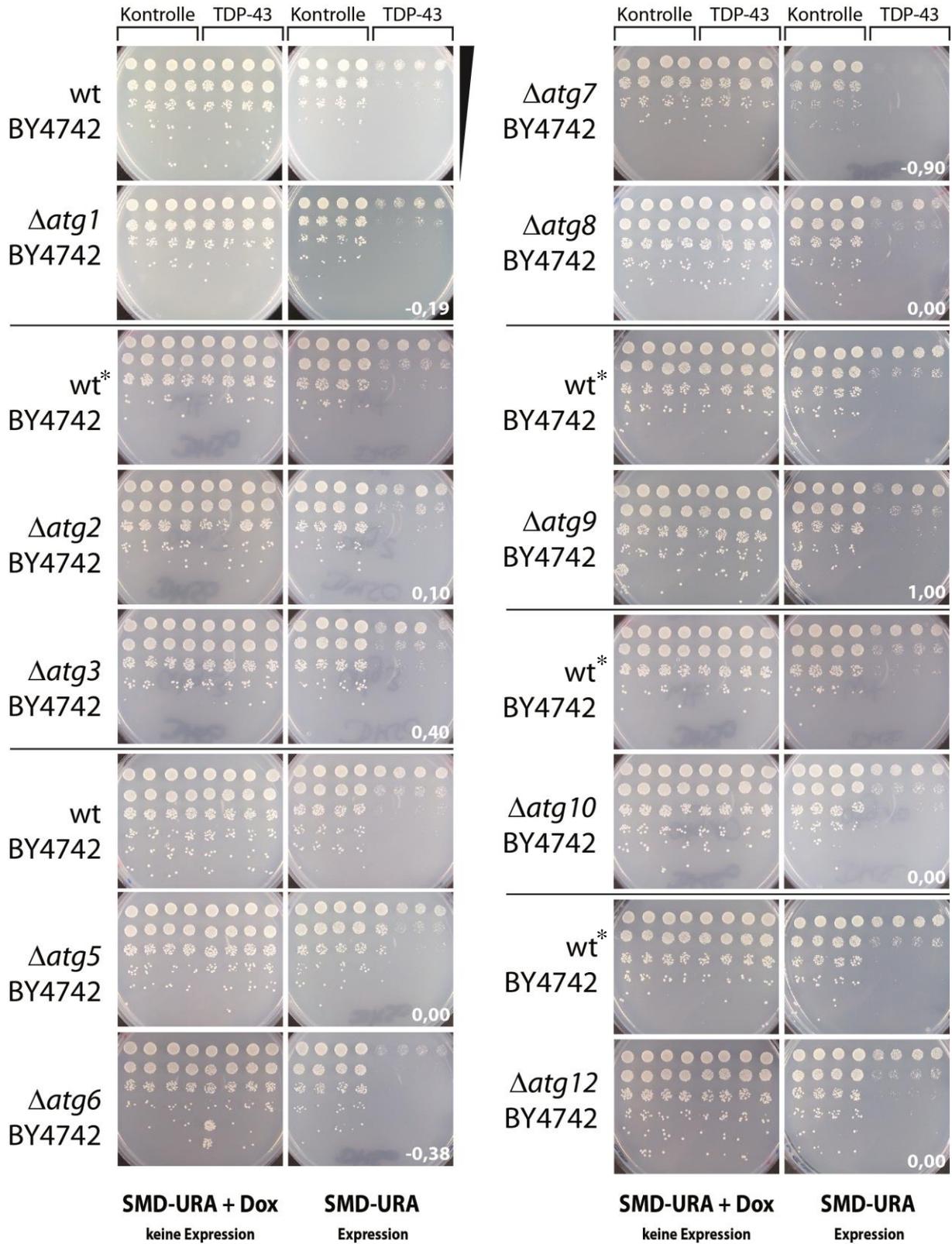
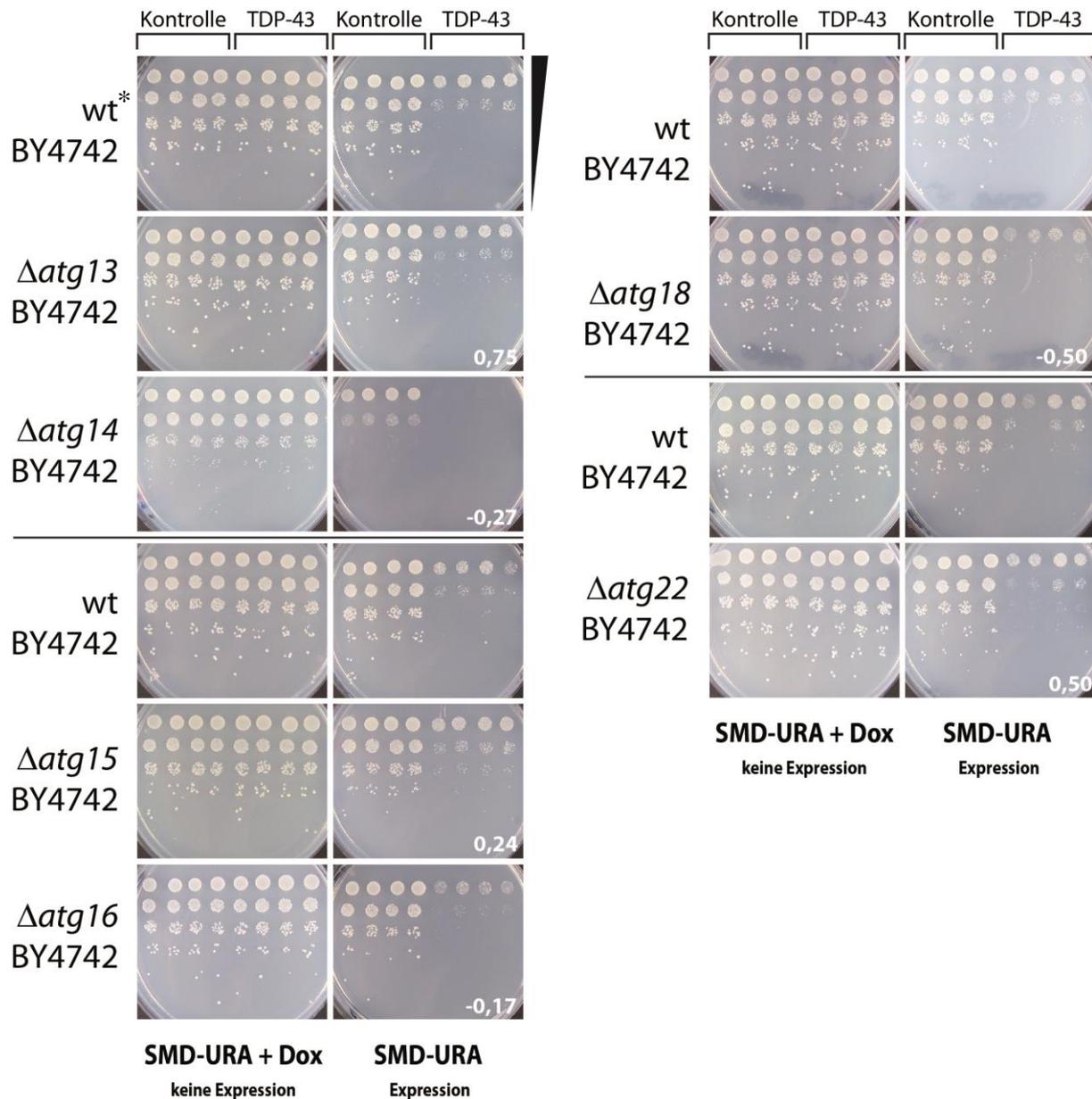


Abb. 12: Abbildungsbeschreibung siehe Fortsetzung nächste Seite.



**Abb. 12 Fortsetzung: Die Expression von TDP-43 verursacht ein Wachstumsdefizit beim wt und den ATG-Kernkomponenten.** Der Wildtyp und die Deletionsstämme wurden mit einem Doxycyclin-abhängigen Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert. Anschließend erfolgten das Tüpfeln auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) und die Inkubation für drei Tage. Das Wuchsverhalten der 16 analysierten Deletionsstämme gegenüber dem wt umfasste ein breites Spektrum von stark reduziert bis deutlich verbessert (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden (z. B. Mitophagie-assoziierte Deletionsstämme alphabetisch hintereinander geordnet).

Deletionsstämme. Er besaß sowohl nach drei als auch nach sechs Tagen den höchsten Wachstumsindex (1,485 und 1,60) aller 109 bzw. 105 untersuchten Mutationsstämme. Slg1 ist ein stressinduzierbarer Zellwandsensor, der die Mitophagie fördert (Ketela *et al.* 1999, Lodder *et al.* 1999, Mao *et al.* 2011). Auch andere, an der Mitophagie beteiligte

Deletionsstämmen, wie  $\Delta pbs2$  und  $\Delta atg32$ , zeigten ein verbessertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp. Im Gegensatz dazu war  $\Delta mdm34$  mit -1,5 (Tag 3) und -0,6 (Tag 6) ein Deletionsstamm mit einem stark negativen Wachstumsindex.

Neben den Mitophagie-relevanten Genen wurden Deletionsstämmen für den Cvt-Weg und die Pexophagie ausgewertet (siehe Anhang Abb. VII). Bei beiden Wegen konnten Stämme mit reduziertem oder verbessertem Index identifiziert werden. Beispiele hierfür waren  $\Delta atg21$  (Cvt-Weg) und  $\Delta atg36$  (Pexophagie) mit einem positiven Wachstum an beiden Dokumentationstagen. Andererseits besaßen  $\Delta atg11$  und  $\Delta atg19$  ein negatives Wachstum gegenüber dem Referenzstamm (siehe Anhang Tab. I und II). Diese Ergebnisse lassen bei keinem der untersuchten selektiven Autophagiewege eine eindeutige Schlussfolgerung zu. Sowohl bei der Mitophagie als auch bei der Pexophagie und beim Cvt-Weg konnten Deletionsstämmen mit verbesserten und verschlechterten Wachstumsindizes gefunden werden. Jedoch zeigten Deletionsstämmen, denen bedeutende Schlüsselkomponenten, wie Atg32 und Atg36 fehlten, einen positiven Wachstumsindex. Dies ist erstaunlich, da der Verlust dieser Gene/Proteine eine Störung der Mitophagie bzw. Pexophagie induziert, die TDP-43-bedingte Zytotoxizität allerdings reduziert. Als Konsequenz würde das für eine schädliche Wirkung beider selektiven Wege sprechen. Insofern sollten weitere Stämme analysiert werden, um die Rolle der selektiven Autophagieprozesse bei der TDP-43-verursachten Zytotoxizität eindeutig zu klären.

In der letzten Untergruppe wurden weitere Autophagie-relevante Stämme analysiert. Zu diesen zählten, mit einem verbessertem Wachstum, der  $\Delta atg31$ - und der  $\Delta atg41$ -Stamm.  $\Delta atg17$  und  $\Delta atg29$  hingegen zeigten einen verminderten Wuchs gegenüber dem Wildtyp. Des Weiteren zeigte der  $\Delta pep4$  Deletionsstamm einen interessanten Phänotyp. Er besaß sowohl nach drei Tagen (-0,448), als auch nach sechs Tagen (-0,300) ein reduziertes Wachstum (siehe Anhang Abb. VIII). Interessant ist der Stamm auf Grund seiner Funktion als vakuoläre Proteinase und wegen seiner Rolle bei der posttranslationalen Reifung weiterer vakuolärer Hydrolasen (Ammerer *et al.* 1986, Woolford *et al.* 1986). Es ist möglich, dass die verstärkte Wachstumsreduktion auf eine gestörte vakuoläre TDP-43-Eliminierung und eine toxische Anreicherung von TDP-43 in der Zelle zurückzuführen ist. Um die Bedeutung von Pep4 beim Abbau von TDP-43 näher zu untersuchen, wurden weitere Experimente mit dem Deletionsstamm durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.1). Im Allgemeinen war bei dieser Gruppe, wie bereits bei den anderen beiden Untergruppen, keine eindeutige TDP-43-Toxizität verstärkende bzw. reduzierende Wirkung erkennbar.

Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse ist keine eindeutige Aussage zur Rolle der Autophagie bei der TDP-43-bedingten Zytotoxizität möglich. Die Wachstumsindizes der Autophagie-relevanten Deletionsstämme variierte von stark verbessert bis stark verschlechtert. Möglicherweise sind die Mitophagie, die Pexophagie und die vakuoläre Aktivität (Pep4) negative bzw. positive Modulatoren der TDP-43-Toxizität (siehe oben). Die Makroautophagie (in Abhängigkeit der Autophagosomenbildung) hingegen scheint eine untergeordnete Rolle bei der TDP-43-verursachten Zellschädigung zu spielen. Deswegen wurden andere proteolytische Mechanismen, wie der endosomal-vakuoläre Weg im Zusammenhang mit der TDP-43-Zytotoxizität untersucht.

Der endosomal-vakuoläre Transportweg ist eine zweite, potenzielle Möglichkeit toxische Proteine, wie TDP-43, aus der Zelle zu entfernen. Dieser setzt sich aus der frühen Endozytose und dem multivesikulären-Körper (MVB)-Weg mit den ESCRT-Komplexen zusammen. Um deren Rolle bei der Entfernung von TDP-43 zu untersuchen, wurden sieben bzw. 11 Deletionsstämme getüpfelt.

Bei der Endozytose zeigten zwei Stämme (28,6%) ein verbessertes, vier (57,1%) ein reduziertes und einer (14,3%) ein ähnliches Wachstum am dritten Tag (Abb. 13). Am sechsten Inkubationsstag hatten vier Deletionsstämme (57,1%) ein erhöhtes, einer (14,3%) ein vermindertes und zwei (28,6%) ein identisches Wachstum verglichen mit dem Wildtyp. Interessanterweise zählte zu den wachstumsfördernden Deletionsstämmen der  $\Delta npr1$ -Stamm. Er zeigte an beiden Dokumentationstagen einen stark positiven Wachstumsindex (0,528 an Tag 3 und 1,00 an Tag 6). Npr1 ist eine Proteinkinase und inhibiert durch die Phosphorylierung von Ldb19 die Endozytose (MacGurn *et al.* 2011). Auf Grund der Deletion von *NPR1* wird die Hemmung von Ldb19 verhindert und die Endozytose gesteigert. Darüber hinaus konnten am dritten Tag vier Stämme ( $\Delta ede1$ ,  $\Delta ent1$ ,  $\Delta end3$ ,  $\Delta slal$ ) mit negativen Wachstumsindizes identifiziert werden. Eine Hemmung der Endozytose führte bei diesen Deletionsstämmen zu einer Steigerung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Endozytose eine protektive Wirkung auf TDP-43-exprimierende Zellen hat, möglicherweise weil dieser Prozess an der Beseitigung von TDP-43 beteiligt ist. Noch eindeutiger scheint der MVB-Weg (bzw. die ESCRT-Komplexe) die TDP-43-bedingte Zytotoxizität zu mindern. Von den 11 untersuchten Deletionsstämmen zeigten neun (81,8%) einen negativen Wachstumsindex an Tag 3. Ein weiterer Stamm war positiv (9,1%) und einer (9,1%) ähnlich dem Referenzstamm (Abb. 13). Nach sechs Inkubationstagen hatten noch fünf Stämme (45,4%) ein reduziertes, vier (36,4%) ein gesteigertes und zwei (18,2%) ein gleiches Wachstum wie der wt Stamm.

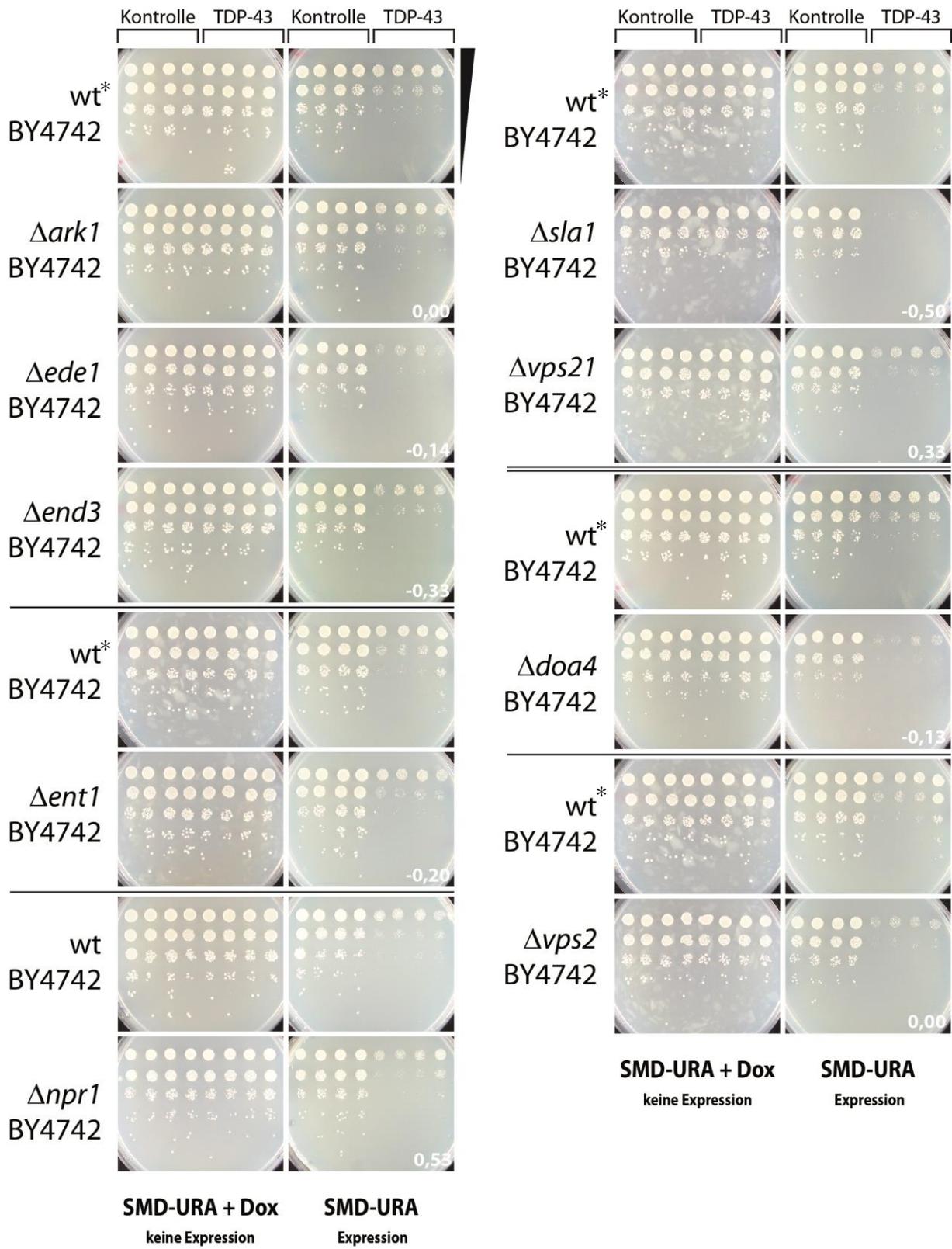
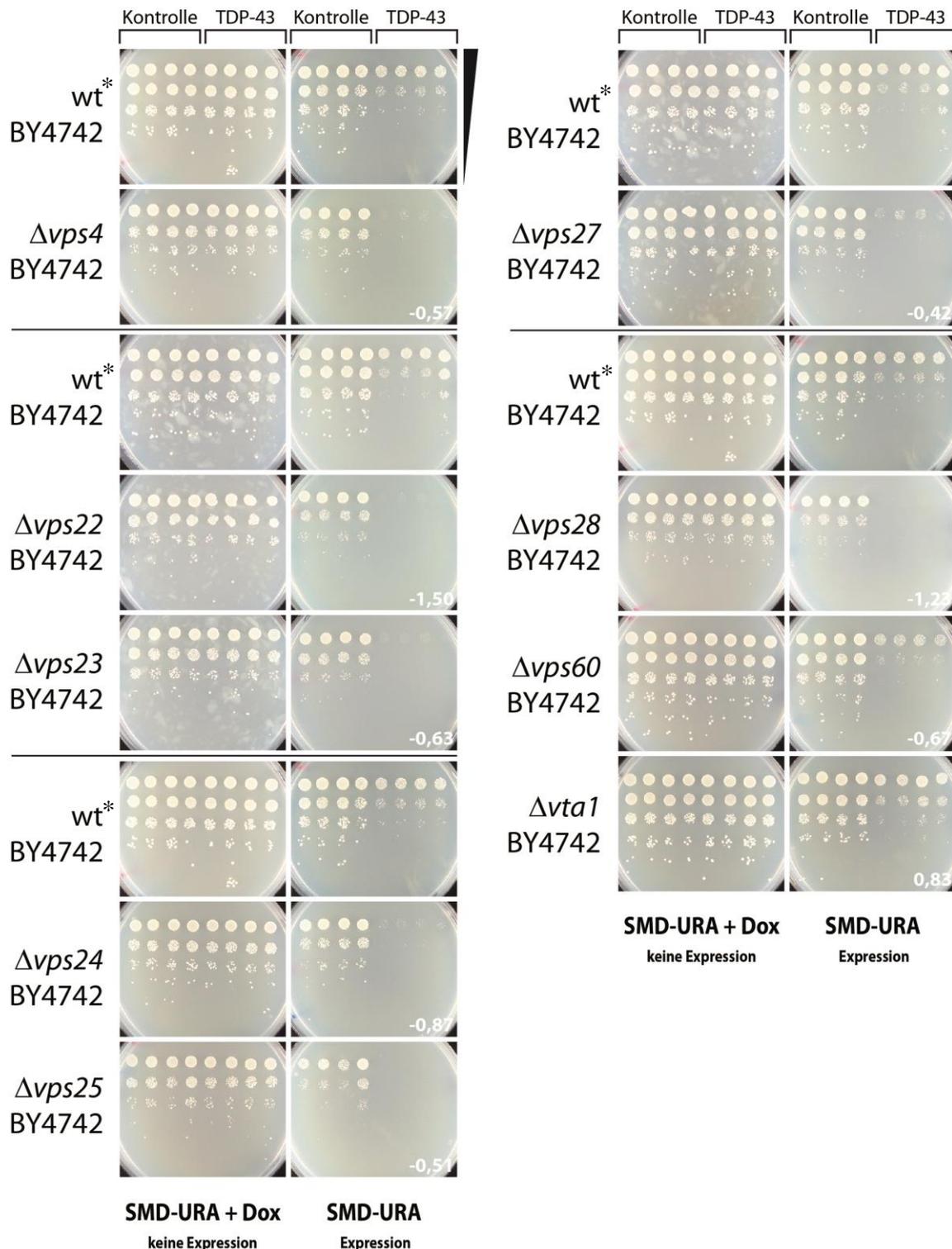


Abb. 13: Abbildungsbeschreibung siehe Fortsetzung nächste Seite.



**Abb. 13 Fortsetzung: TDP-43 verursacht ein Zellwachstumsdefizit beim wt und bei verschiedenen Deletionsstämmen für die frühe Endozytose und den MVB-Weg.** Der Wildtyp und die Mutationsstämmen wurden mit einem Doxycyclin-abhängigen Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert, auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) getüpfelt und für drei Tage inkubiert. Die 18 untersuchten Deletionsstämmen zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein überwiegend vermindertes Wachstum (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die Doppellinie grenzt die Stämme für die Endozytose (erster Teil) und den MVB-Weg (zweiter Teil) ab. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ausschalten eines ESCRT-Proteins eine erhebliche Verschlechterung des Zellwachstums zur Folge hat. Somit trägt eine funktionierende ESCRT-Maschinerie maßgeblich zur Linderung der durch TDP-43-verursachten Toxizität bei. Dies könnte daran liegen, dass der MVB-Weg (und damit die ESCRT-Maschinerie) am Abbau von schädlichem TDP-43 beteiligt ist.

#### 4.1.5 Veränderung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität bei verschiedenen Vakuolenfusionsmutanten

Die in der Autophagie und im MVB-Weg gebildeten Vesikel verschmelzen unweigerlich mit der Vakuole. Bei dieser vakuolären Fusion können Vakuolen entweder mit Vakuolen (homotypische Fusion) oder mit anderen Vesikeln (heterotypische Fusion) verschmelzen (Wickner 2002, Klionsky 2005, Ostrowicz *et al.* 2008). Molekulargenetische Studien haben gezeigt, dass sich die benötigte Proteinmaschinerie bei beiden Arten nicht unterscheidet (Klionsky 2005). Bei beiden vakuolären Transportwegen verschmelzen die gebildeten Vesikel (Autophagosomen bzw. MVBs) mit der Vakuole, um die transportierten Materialien in wiederverwendbare Stoffwechselbausteine umzusetzen.

Es wurden 10 Stämme mit deletierten Vakuolenfusionskomponenten untersucht. Am dritten und am sechsten Inkubationstag besaßen acht (80%) der 10 Stämme ein verschlechtertes und zwei (20%) ein verbessertes Wachstum gegenüber dem Referenzstamm (Abb. 14). An beiden Dokumentationstagen wurden für  $\Delta ybt1$ , im Gegensatz zu den meisten anderen Deletionsstämmen, tendenziell positive Wachstumsindizes ermittelt (0,20 an Tag 3 und 0,33 an Tag 6). Während bei den restlichen Stämmen die Deletion zu einer Beeinträchtigung der Vakuolenfusion führt, forciert  $\Delta ybt1$  die Verschmelzung. Ybt1 ist ein ABC- (*ATP-Binding Cassette*) Transporter und in der Vakuolenmembran lokalisiert. Ursprünglich wurde Ybt1 als ATP-abhängiger Gallensäuretransporter und  $Ca^{2+}$ -Regulator in der Zelle identifiziert (Ortiz *et al.* 1997, Sasser *et al.* 2012 B). Sasser *et al.* 2012 (B) konnten nachweisen, dass die Deletion von *YBT1* eine Steigerung der homotypischen Vakuolenfusion zur Folge hat. Die Autoren zeigten, dass der  $\Delta ybt1$ -Stamm einerseits eine verlängerte  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in die Vakuolen und andererseits eine verzögerte SNARE- (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*) abhängige  $Ca^{2+}$ -Abgabe aufwies. Dies ist möglicherweise die Ursache für eine verbesserte Funktion der SNARE-Proteine und für die forcierte Vakuolenfusion.

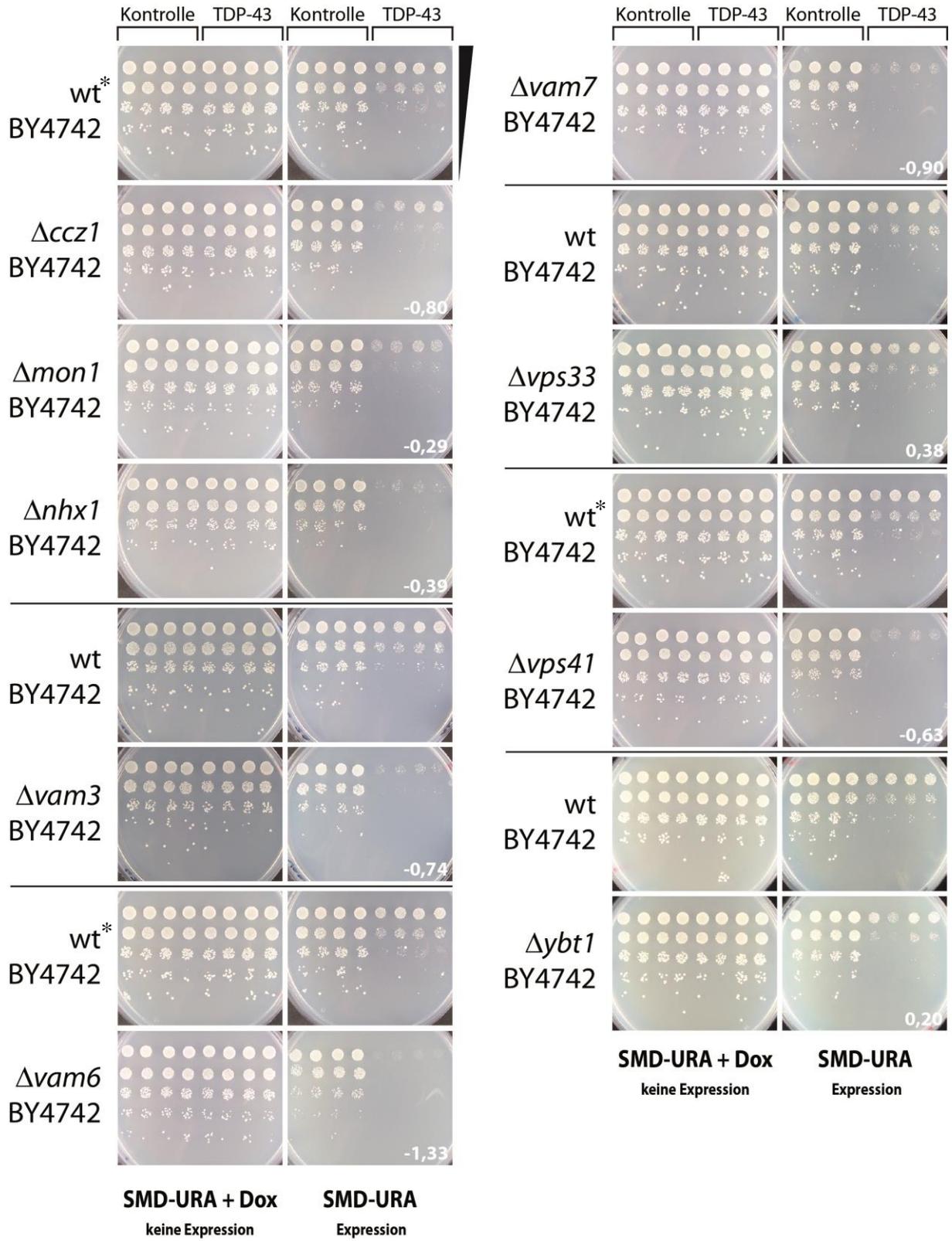
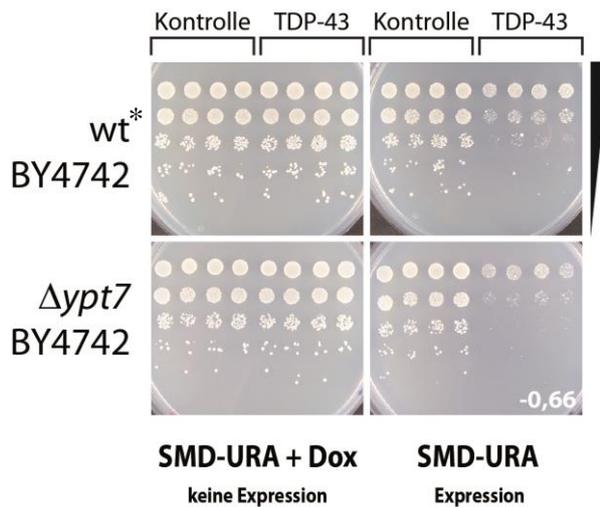


Abb. 14: Abbildungsbeschreibung siehe Fortsetzung nächste Seite.



**Abb. 14 Fortsetzung: Die TDP-43-bedingte Zytotoxizität ist in den Vakuolenfusionsmutanten gegenüber dem wt hauptsächlich verstärkt.** Der Wildtyp und die Deletionsstämme wurden mit einem Doxycyclin-abhängigen Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert, auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) getüpfelt und für drei Tage inkubiert. Der überwiegende Teil der Deletionsstämme zeigten einen verminderten Wuchs gegenüber dem Wildtyp (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \*

gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden.

Die Blockierung der vakuolären Fusion in den übrigen Deletionsstämmen führte zu einer starken Zunahme der TDP-43-bedingten Toxizität und einer starken Wachstumsreduktion. Beispiele hierfür sind  $\Delta vam6$  (-1,33 an Tag 3 und -0,50 an Tag 6),  $\Delta vam3$  (-0,74 an Tag 3 und -0,58 an Tag 6) oder  $\Delta ypt7$  (-0,66 an Tag 3 und -0,62 an Tag 6). Der  $\Delta vam3$  Deletionsstamm wurde exemplarisch für eine gestörte Vakuolenfusion in weiteren Experimenten eingesetzt (siehe Abschnitt 4.3.1). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine funktionierende vakuoläre Verschmelzung die TDP-43-verursachte Toxizität mildert und das zelluläre Wachstum verbessert. Dies könnte daran liegen, dass schädliches TDP-43 über vakuoläre Proteinabbauwege eliminiert wird.

Mit Hilfe des Tüpfeltestscreens konnten insgesamt 109 Deletionsstämme methodisch auf ihr Wachstumsverhalten während der Expression von TDP-43 untersucht und verglichen werden. Es zeigte sich, dass die Peroxisomen möglicherweise an der Detoxifizierung von TDP-43 beteiligt sind. Allerdings war der protektive Effekt hauptsächlich nach drei Tagen erkennbar. Ferner könnte das UPS an der Beseitigung des toxischen Proteins involviert sein. Die Beteiligung des endosomalen Proteinwegs (Endozytose und MVB-Weg) und der vakuolären Fusion erscheinen hingegen eindeutig. Beide bedingen eine Linderung der durch TDP-43-verursachten Toxizität. Nicht relevant ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Makroautophagie bei der TDP-43-Zytotoxizität.

## 4.2 TDP-43 verändert die Vakuolenmorphologie und beeinflusst verschiedene vakuoläre Abbauwege

Mit Hilfe des Tüpfeltestscreens konnten erste Hinweise für die Beteiligung der vakuolären Fusion und des endosomal-vakuolären Transportwegs bei der TDP-43-bedingten Zytotoxizität gefunden werden. Darüber hinaus konnten in mehreren Veröffentlichungen phänotypische Veränderungen in Zellorganellen, wie den Mitochondrien, bedingt durch die Expression von ALS-assoziierten Proteinen nachgewiesen werden (Hirano *et al.* 1984, Chung und Suh 2002, Vande Velde *et al.* 2011, Magrané *et al.* 2014). Auf Grund der Beteiligung der Vakuole am Eliminierungsprozess von Proteinen wurden die Auswirkungen der TDP-43-Expression auf die Vakuolenmorphologie und die vakuolären Transportwege (Autophagie, Endozytose und MVB-Weg) mit verschiedenen fluoreszenzmikroskopischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden untersucht.

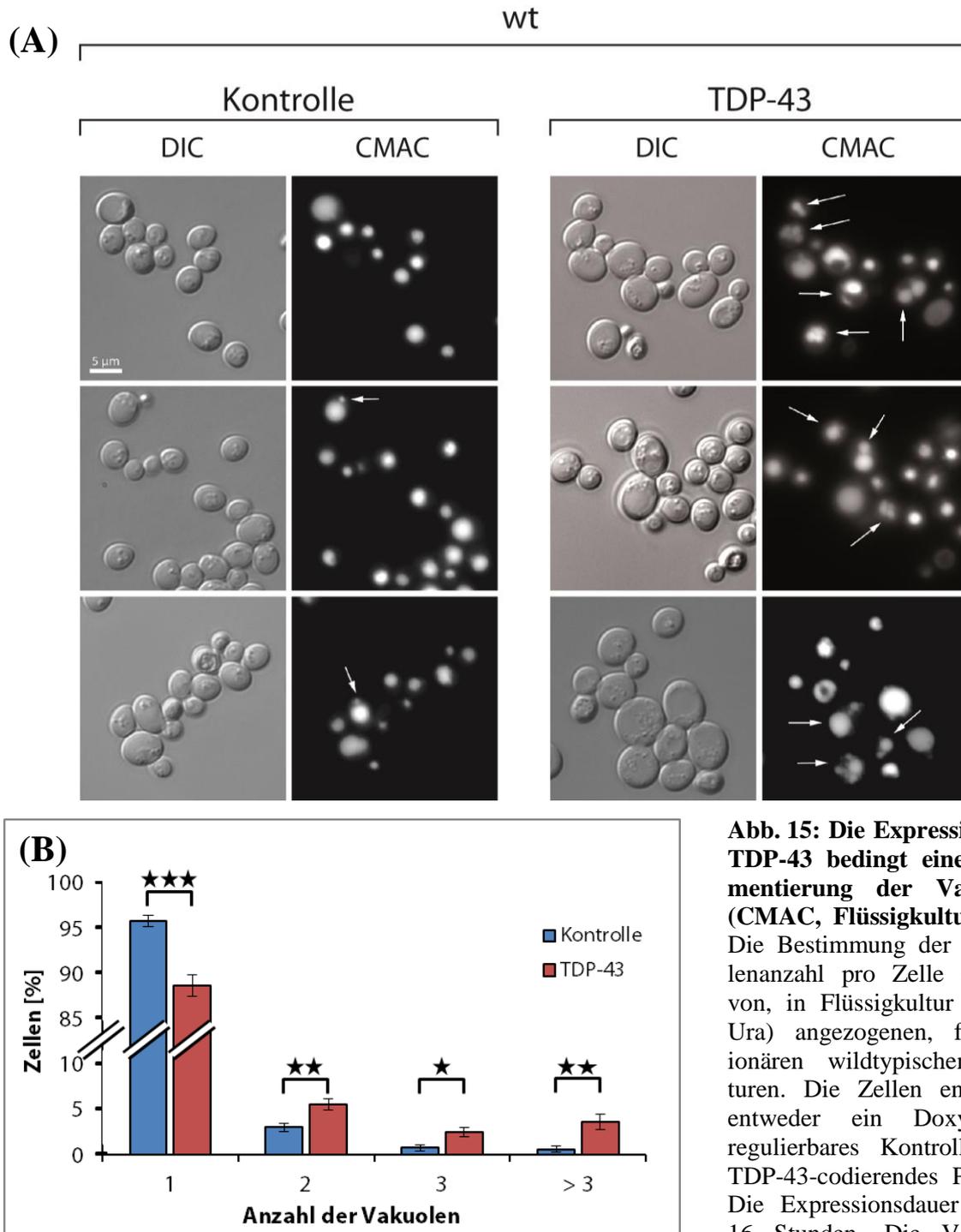
### 4.2.1 TDP-43-Expression führt zur Fragmentierung der Vakuolen

Unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzmikroskopie und unterschiedlicher Marker wurde das phänotypische Erscheinungsbild der Vakuole analysiert. Des Weiteren kamen mehrere Medienarten, TDP-43-codierende Expressionskonstrukte und die chemische Substanz Propranolol zum Einsatz. Es sollte untersucht werden, ob die Expression von TDP-43 eine vakuoläre Fragmentierung *per se* bedingt und ob eine forcierte Vakuolenfragmentierung die TDP-43-verursachte Toxizität steigert oder reduziert.

Im ersten Assay wurden wildtypische Hefezellen, welche ein Kontroll- oder TDP-43-codierendes Konstrukt (pCM190) enthielten, in Flüssigmedium (SMD-Ura) angezogen. Nach 16 Stunden Expression erfolgten die Behandlung mit dem Vakuolenfarbstoff CMAC und die fluoreszenzmikroskopische Analyse (siehe Abschnitt 3.5.4 und 3.10). Die analysierten Zellen unterteilten sich in vier Gruppen: Zellen mit einer, zwei, drei oder mehr als drei Vakuolen. Bei der Expression von TDP-43 wurde eine eindeutige Abnahme der Zellen mit einer Vakuole und eine signifikante Zunahme der Vakuolenanzahl je Zelle beobachtet (Abb. 15).

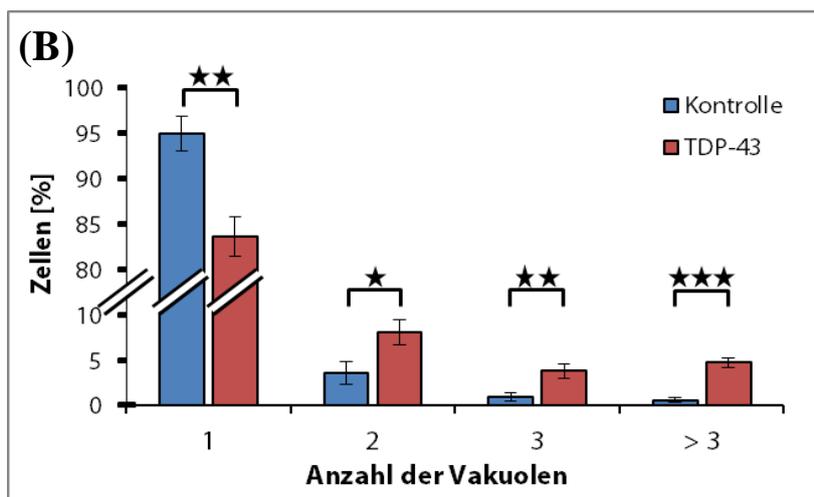
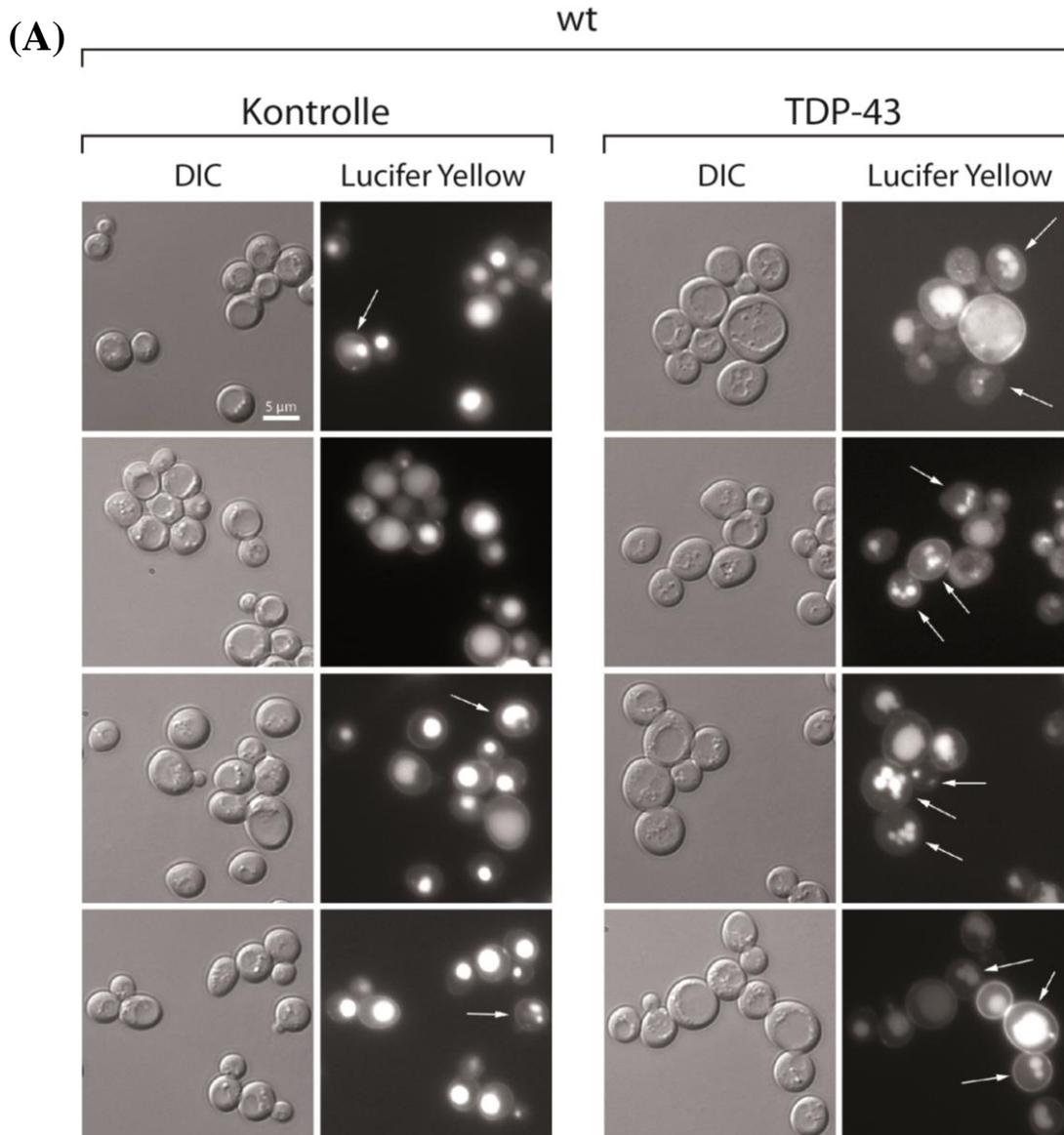
Der Einsatz eines zweiten vakuolären Farbstoffs konnte diese Resultate bestätigen. Der primär für die Endozytose eingesetzte Marker Lucifer Yellow ist ein Naphthalimid-Derivat, das nach erfolgreicher Aufnahme in die Zelle dessen Vakuole farbig kennzeichnet (Stewart 1978, 1981, Riezman 1985). Im entsprechenden Experiment wurden logarithmische wildtypische Hefen, welche das Kontrollplasmid enthalten bzw. TDP-43 exprimieren, mit Lucifer Yellow behandelt und mikroskopisch untersucht (siehe Abschnitt 3.5.4 und 3.10). Im

Wesentlichen konnten mit diesem Ansatz die Ergebnisse des CMAC-Versuchs bestätigt werden. Es wurde eine signifikante Abnahme der Zellpopulation mit einer Vakuole beobachtet. Zugleich stieg die Anzahl der Zellen mit zwei, drei oder mehr als drei Vakuolen (Abb. 16).



**Abb. 15: Die Expression von TDP-43 bedingt eine Fragmentierung der Vakuolen (CMAC, Flüssigkultur).** (A) Die Bestimmung der Vakuolenanzahl pro Zelle erfolgte von, in Flüssigkultur (SMD-Ura) angezogenen, frühstationären wildtypischen Kulturen. Die Zellen enthielten entweder ein Doxycyclin-regulierbares Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid. Die Expressionsdauer betrug 16 Stunden. Die Vakuolen

wurden mit CMAC angefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. Pfeile: Zellen mit vakuolärer Fragmentierung. (B) Quantifizierung der Vakuolenanzahl pro Zelle, wie in (A) beschrieben. Die Expression von TDP-43 führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellen mit einer Vakuole. Im Gegenzug stieg die Zellanzahl mit mehreren Vakuolen. Der Mittelwert wurde von vier Klonen (über 100 Zellen) aus zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abb. 16: Die Expression von TDP-43 verursacht eine Fragmentierung der Vakuolen (Lucifer Yellow, Flüssigkultur).** (A) Die wildtypischen Zellen mit einem Doxycyclin-regulierbarem Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt wurden in Flüssigkultur (SMD-Ura) in die logarithmische Phase überführt und mit Lucifer Yellow gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. Pfeile: Zellen mit vakuolärer

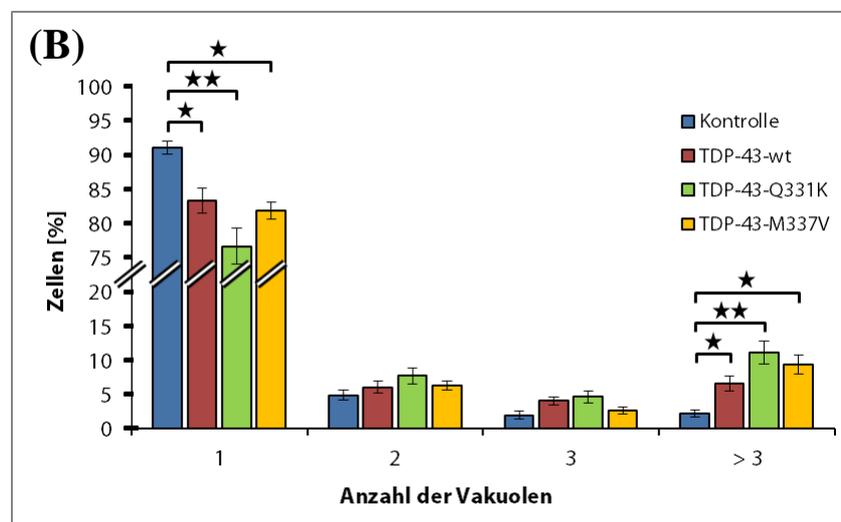
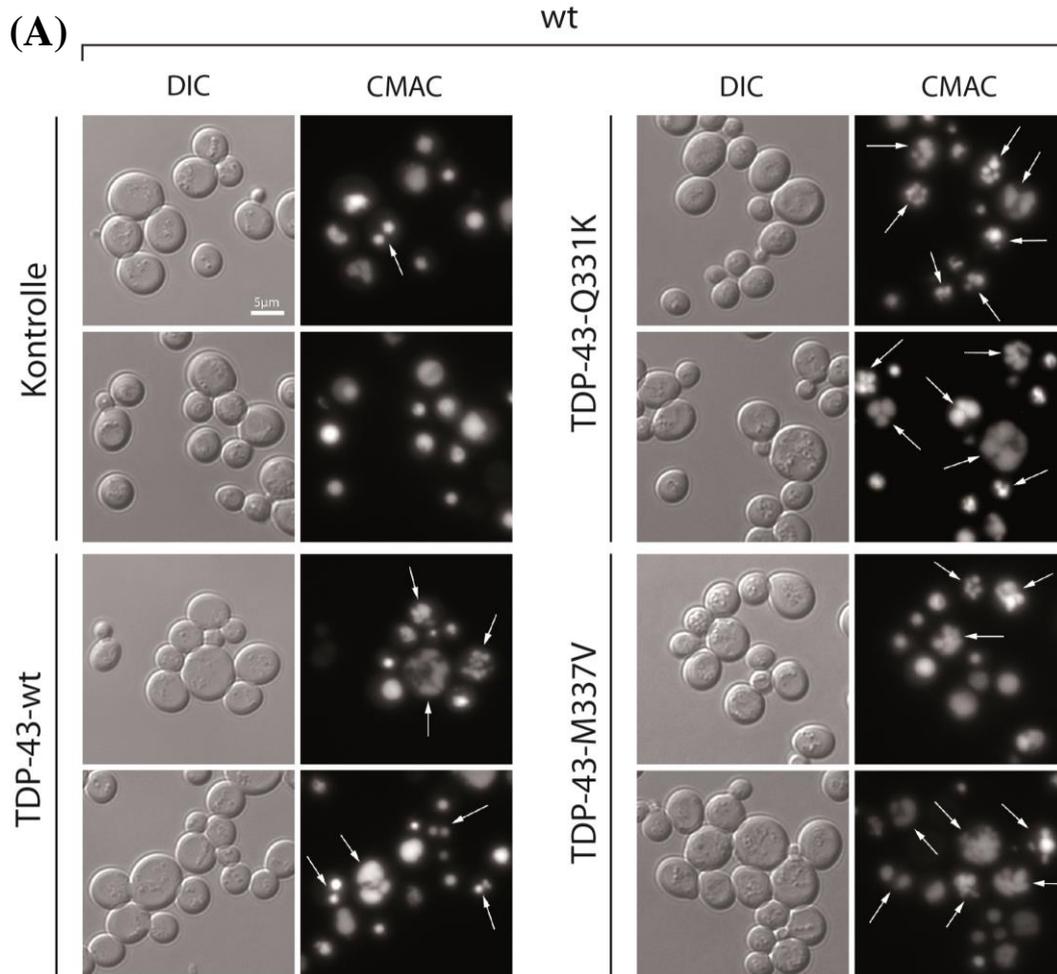
Fragmentierung. (B) Quantifizierung der Vakuolenanzahl pro Zelle wie in (A) beschrieben. Die TDP-43-Expression bedingte eine signifikante Abnahme der Zellen mit einer Vakuole. Gleichzeitig stieg die Anzahl der Zellen mit mehreren Vakuolen. Der Mittelwert ergab sich aus sechs Klonen (über 100 Zellen) zweier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05., \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

Der Effekt der vakuolären Fragmentierung konnte mit verschiedenen TDP-43-Expressionsvektoren, beobachtet werden. So führte die Expression von TDP-43 mittels eines Galaktose-induzierbaren Konstrukts ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Zellen mit nur einer Vakuole und zu einem prägnanten Anstieg der Zellpopulation mit mehr als drei Vakuolen (Abb. 17). Neben dem wildtypischen TDP-43 wurden auch ALS-assoziierte Varianten, wie TDP-43-Q331K und TDP-43-M337V, analysiert. Bei beiden Varianten konnte eine verstärkte pathophysiologische Vakuolenmorphologie im Vergleich zum wildtypischen TDP-43 beobachtet werden (Abb. 17).

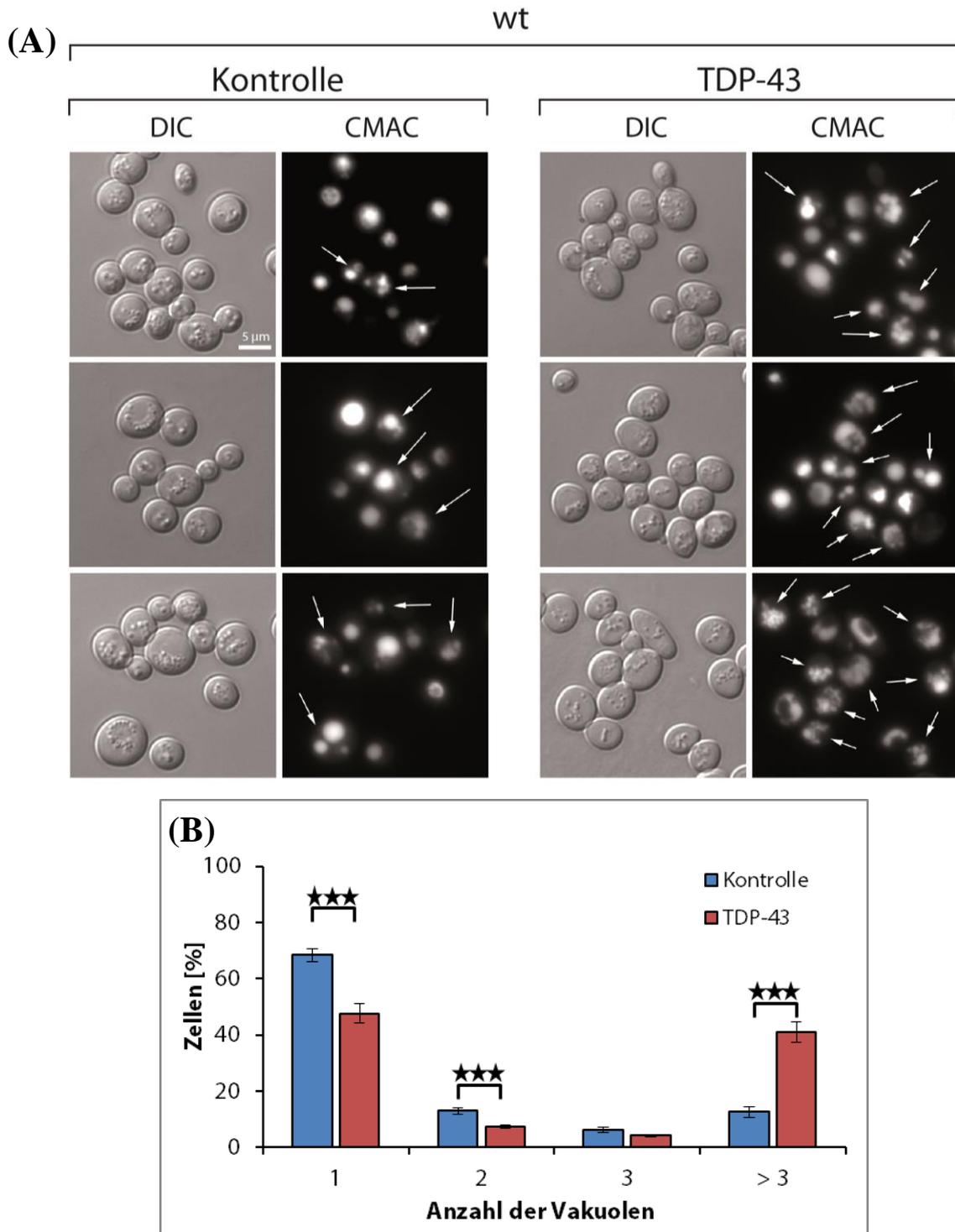
Interessanterweise zeigte die Q331K-Variante den stärksten Effekt. Diese Mutation wurde erstmals von Johnson *et al.* (2009) für die Hefe beschrieben. Die Autoren wiesen mit Hilfe der Tüpfeltestmethode nach, dass die Q331K-Modifikation einen deutlich toxischeren Effekt auf die Zellen hatte, als die Wildtypvariante. Diese Beobachtung konnte in der eigenen Arbeit verifiziert werden (siehe unten). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die vakuoläre Fragmentierung und die Zytotoxizität miteinander korrelieren.

Um weitere Indizien für diese Behauptung zu erlangen, wurden TDP-43-exprimierende Zellen nicht nur in Flüssigkultur, sondern auch auf festen Medien angezogen (Abb. 18). Die drei Tage alten Zellen wurden geerntet, mit CMAC gefärbt und mikroskopisch analysiert (siehe Abschnitt 3.5.4 und 3.10). Die Vakuolenfragmentierung war bei dieser Art der Kultivierung sehr viel stärker ausgeprägt als bei den Zellen im Flüssigmedium. Diese Beobachtung kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die Expressionsdauer drei Tage und nicht nur 16 Stunden betrug. Zusätzlich zu der Zellpopulation mit einer Vakuole nahm auch die Gruppe mit zwei Vakuolen dramatisch ab. Im Gegenzug war die Zellgruppe mit mehr als drei Vakuolen markanter ausgeprägt, als die im flüssigen Medium.

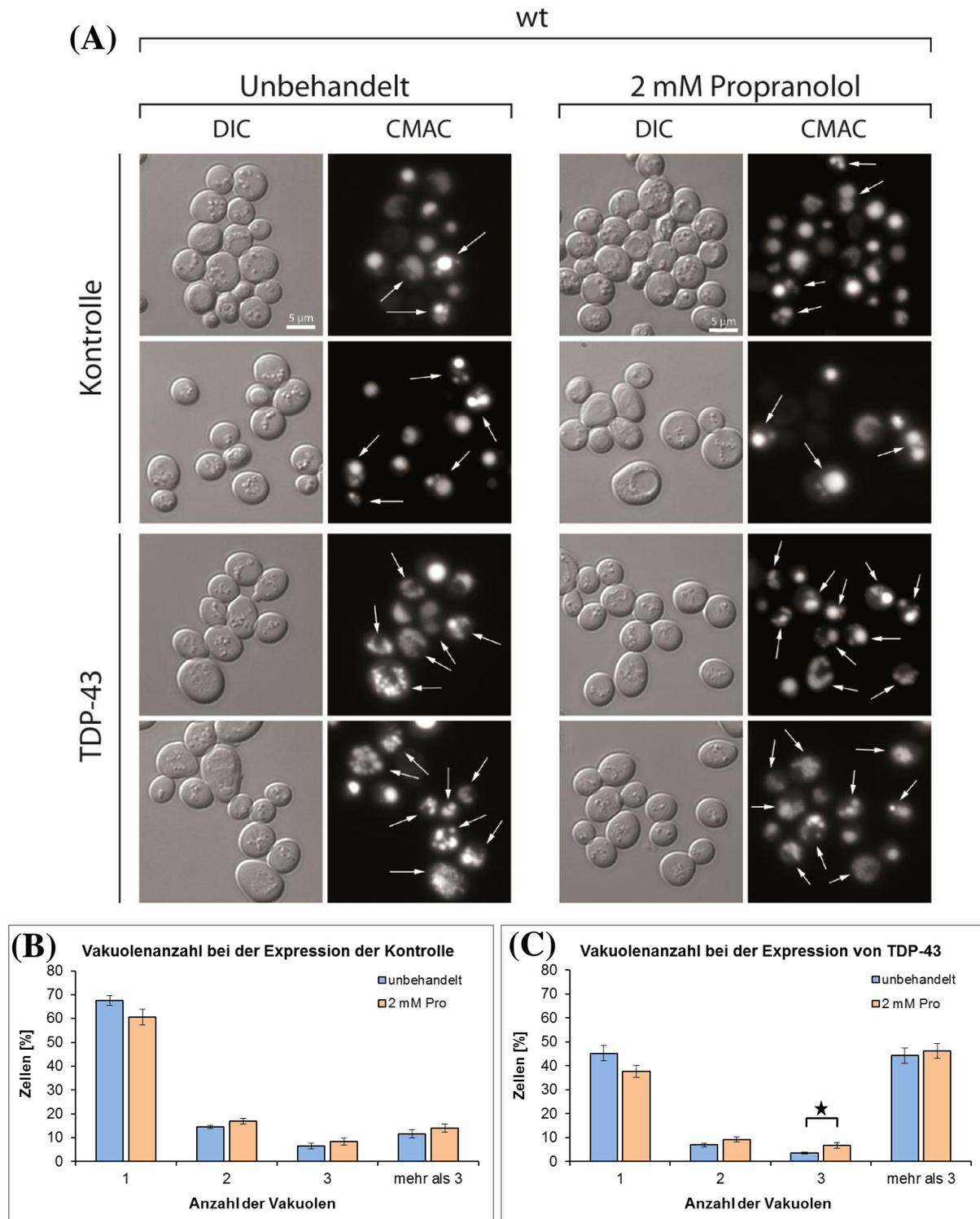
In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Vakuolenfragmentierung pharmakologisch mit Propranolol forciert. Propranolol ist ein Betablocker, welches in der Humanmedizin zur Behandlung von Hypertonie eingesetzt wird (Black *et al.* 1964, Stapleton 1997). In der Hefe führt diese Chemikalie u. a. zur Hemmung der Phosphatidsäure (PA) Phosphatase und bedingt nachweislich die Fragmentierung und Deformierung der Vakuole (Sasser *et al.* 2012A). In der vorliegenden Arbeit wurde Propranolol festem Medium beigemischt (siehe Abschnitt 3.5.3 und 3.8). Die phänotypische Untersuchung wildtypischer Zellen, welche TDP-43 exprimierten, erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. Tüpfeltest. Mit Hilfe der CMAC-Färbung konnte die Aussage bestätigt werden, dass Propranolol zu einer Fragmentierung der Vakuolen beiträgt (Abb. 19). Es wurden signifikant



**Abb. 17: Bestimmung der vakuolären Fragmentierung bei der Expression verschiedener TDP-43-Varianten.** (A) Die wildtypischen Zellen enthielten entweder das Kontrollplasmid oder exprimierten Galaktose-induzierbare TDP-43-wt, TDP-43-Q331K oder TDP-43-M337K-Varianten. Die Expressionsdauer betrug 16 Stunden im Flüssigmedium (SMDGal-Ura). Die Vakuolen wurden mit CMAC angefärbt. Maßstab: 5 µm. Pfeile: Zellen mit vakuolärer Fragmentierung. (B) Quantifizierung der Vakuolenanzahl pro Zelle wie in (A) beschrieben. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Expression von TDP-43 zu einer Fragmentierung der Vakuolen, erkennbar durch die Zunahme der Zellen mit mehreren Vakuolen. Die Q331K-Variante zeigte hierbei den stärksten Effekt. Der Mittelwert wurde von acht Klonen (über 100 Zellen) aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.



**Abb. 18: Die Expression von TDP-43 forciert die vakuoläre Fragmentierung von Zellen auf festem Kultivierungsmedium.** (A) Die wildtypischen Zellen, welche ein Doxycyclin-induzierbares Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid enthielten, wurden drei Tage auf Expressionsplatten (SMD-Ura) kultiviert. Die Vakuolen wurden mit CMAC angefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. Pfeile: Zellen mit vakuolärer Fragmentierung. (B) Quantifizierung der Vakuolenanzahl pro Zelle wie in (A) beschrieben. Die Expression von TDP-43 verursachte eine signifikante Abnahme der Zellen mit einer Vakuole. Im Gegenzug nahm die Zellanzahl mit mehreren Vakuolen zu. Der Mittelwert wurde von 13 Klonen (über 100 Zellen) aus vier unabhängigen Experimenten berechnet. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

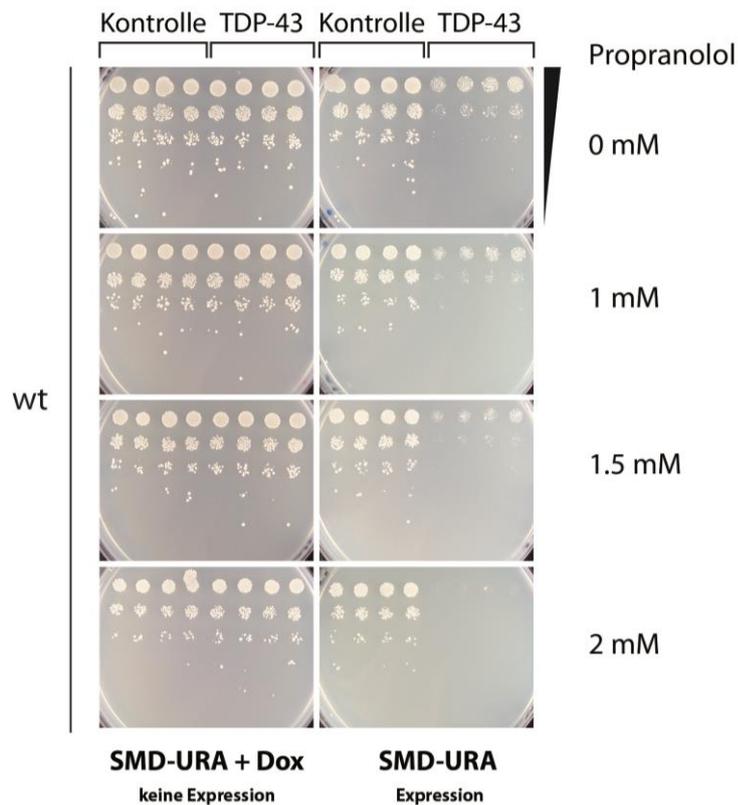


**Abb. 19: Die Zugabe der pharmakologischen Substanz Propranolol fördert die vakuoläre Fragmentierung bei der Expression von TDP-43.** (A) Die Bestimmung der Vakuolenanzahl erfolgte von wildtypischen Kulturen, welche auf festem Expressionsmedium (SMD-Ura) mit 2 mM Propranolol angezogenen wurden. Die Zellen enthielten ein Doxycyclin-regulierbares Kontroll- bzw. TDP-43-codierendes Plasmid. Die Kultivierungsdauer betrug drei Tage. Die Vakuolen wurden mit CMAC angefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. Pfeile: Zellen mit vakuolärer Fragmentierung. (B+C) Quantifizierung der Vakuolenanzahl pro Zelle wie in (A) beschrieben. Durch die Zugabe von Propranolol konnte bei der Expression von TDP-43 eine signifikante Zunahme der Vakuolenanzahl beobachtet werden. Der Mittelwert berechnete sich aus 10 Klonen (über 100 Zellen) von drei unabhängigen Experimenten. Pro: Propranolol; Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

mehr Zellen mit drei Vakuolen gezählt. Des Weiteren führte auch in diesem Experiment die Expression von TDP-43 zu einer Steigerung der Vakuolenanzahl. Bemerkenswert war erneut der Umstand, dass die vakuoläre Fragmentierung bei TDP-43-exprimierenden Zellen deutlich stärker hervortrat, als in den Flüssigkulturen. Ferner konnte im Tüpfeltest nachgewiesen werden, dass die Chemikalie eine Wachstumsreduktion in TDP-43-exprimierenden Hefezellen verursacht (Abb. 20).

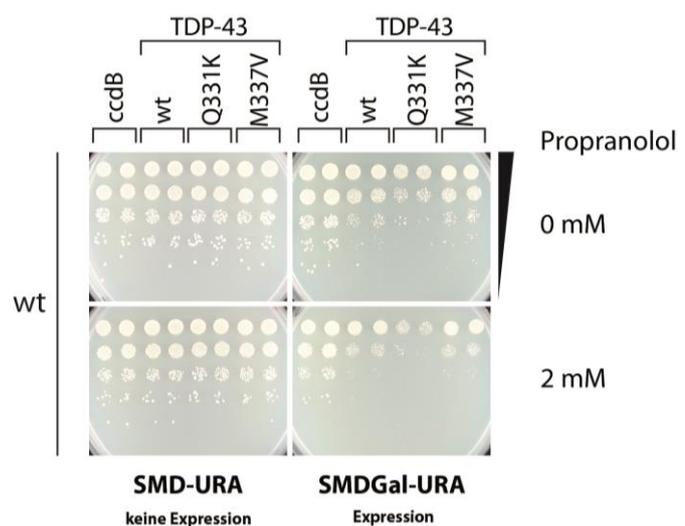
Zusätzlich zu Doxycyclin-regulierbaren TDP-43-Expressionsvektoren wurden Zellen mit Galactose-regulierbaren TDP-43-Expressionsvektoren auf Propranolol-haltigen Platten getüpfelt (Abb. 21). Die bereits bekannten Unterschiede in der Toxizität konnten bei den ALS-assoziierten Varianten verifiziert werden (Johnson *et al.* 2009). Das wildtypische TDP-43 und das TDP-43-M337V hatten vergleichbare wachstumshemmende Auswirkungen. Die Q331K-Variante hatte den toxischsten Effekt auf das Zellwachstum. Die Zugabe von Propranolol führte zu einer Steigerung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität und zu einer Abnahme des Wachstums bei allen TDP-43-Varianten.

Bei allen Experimenten zur Untersuchung der Vakuolenmorphologie konnte eine signifikante vakuoläre Fragmentierung bei der Expression von TDP-43 in den Zellen festgestellt werden. Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass pathophysiologisches TDP-43 den vakuolären Phänotyp nachhaltig verändert. Ursache hierfür könnte die Störung der Vakuolenbiogenese oder -fusion sein. Die pharmakologische Induktion der vakuolären Fragmentierung steigerte die TDP-43-bedingte Zytotoxizität. Dieser Aspekt untermauert die Vermutung, dass die vakuoläre Fragmentierung und die TDP-43-Toxizität miteinander korrelieren.



**Abb. 20: Auswirkungen von Propranolol auf die TDP-43-bedingte Zytotoxizität.** Wildtypzellen mit einem Doxycyclin-regulierbaren Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt wurden auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten getüpfelt und für drei Tage inkubiert. Die Platten enthielten unterschiedliche Konzentrationen an Propranolol (0, 1, 1,5 oder 2 mM). Mit zunehmender Propranololmenge verstärkte sich das TDP-43-verursachte Wachstumsdefizit.

**Abb. 21: Veränderungen im Wachstum bei der Expression unterschiedlicher TDP-43-Varianten und unter Einsatz von Propranolol.** Wildtypische Zellen enthielten entweder das Kontrollplasmid oder exprimierten Galaktose-induzierbare TDP-43-wt, TDP-43-Q331K oder TDP-43-M337V-Varianten. Die Kolonien wuchsen drei Tage auf Nichtexpressions- bzw. Expressionsplatten, welche kein oder 2 mM Propranolol enthielten. Während bei der Kontrolle keine Wachstumsreduktion erkennbar war, zeigten die Hefen mit wildtypischem TDP-43 und der M337V-Variante eine ähnlich starke Zytotoxizität. Die Q331K-Variante bedingte den höchsten Wachstumsrückgang. Die Zugabe von Propranolol steigerte bei allen TDP-43-Varianten das Wachstumsdefizit.

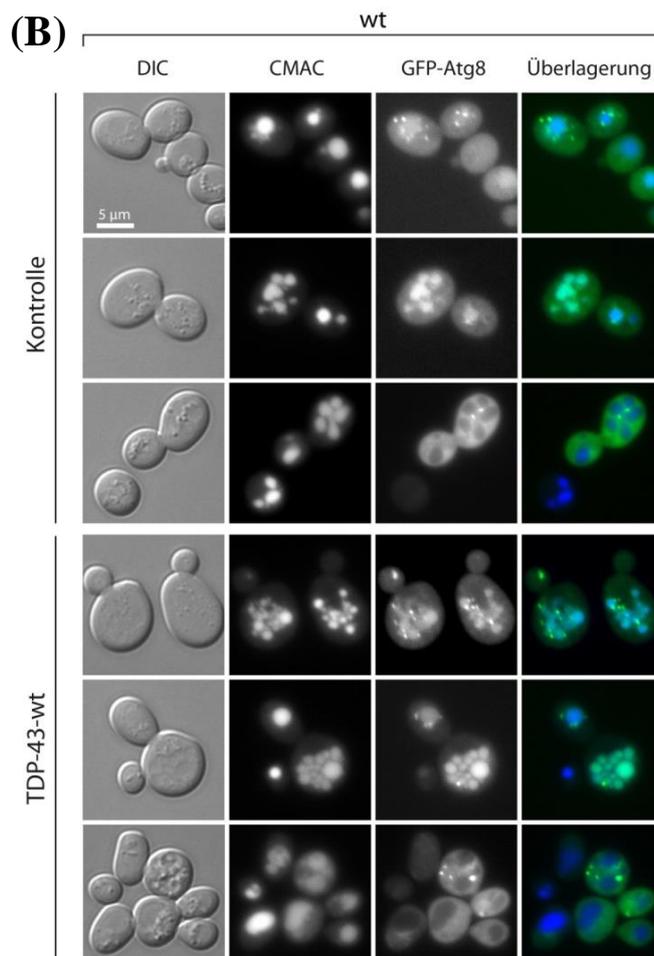
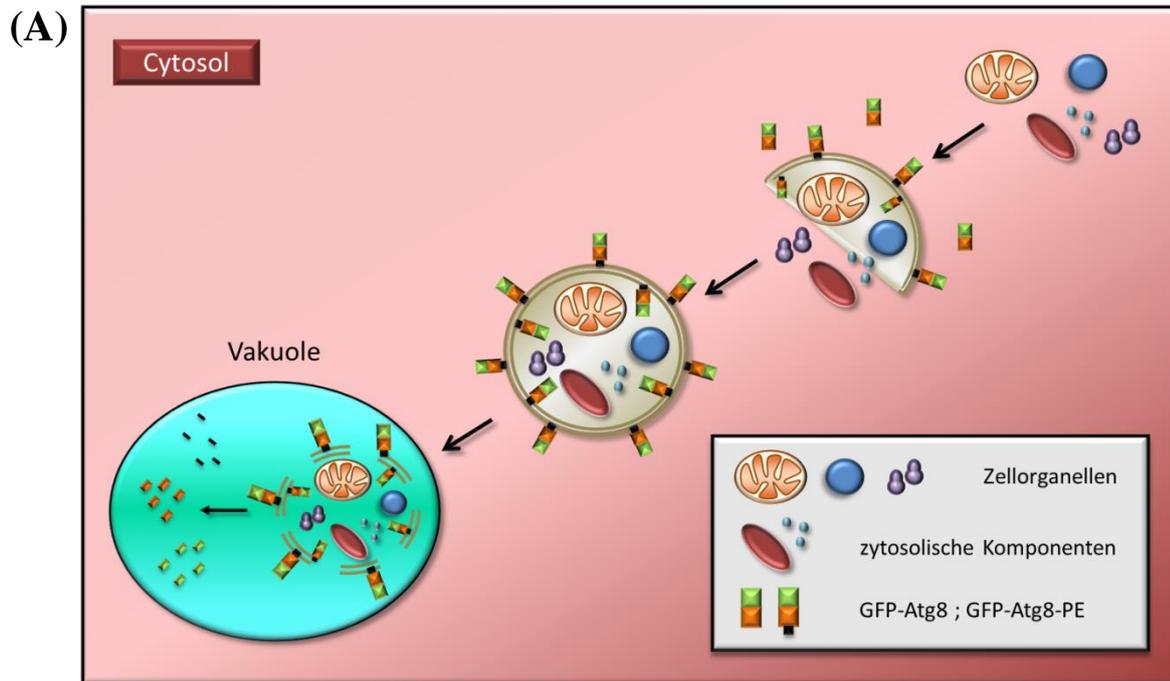


Es ist zu vermuten, dass die Expression von TDP-43 nicht nur morphologische Veränderungen der Vakuole bedingt, sondern auch verschiedene vakuoläre Transportwege, wie die Autophagie, die Endozytose und den MVB-Weg verändert. Diese möglichen Modifikationen sollen im nächsten Abschnitt untersucht werden.

#### 4.2.2 Die TDP-43-Expression forciert den terminalen Abschnitt der Autophagie

Die Veränderungen im autophagischen Prozess wurden mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Ansätze überprüft. Der sogenannte GFP-Atg8-Prozessierungsassay ermöglicht es die Autophagierate unter verschiedenen Bedingungen und in mehreren Stämmen zu beobachten. Die Methode beruht auf der Messung von degradiertem GFP-Atg8 in der Vakuole. GFP-Atg8 ist ein Fusionsprotein, welches im Laufe des autophagischen Prozesses in die Phagophorenmembran verankert wird. Das geschlossene Vesikel oder Autophagosom wird in der Vakuole lysiert und das GFP-Atg8 zu GFP abgebaut. Das freie GFP-Signal gibt den Grad der Autophagie wieder und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. Western Blot bestimmt werden (Abb. 22, 23; Shintani und Klionsky 2004). Für den GFP-Atg8-Assay wurde in einem Vorversuch der Wildtypstamm mit einem Kontroll- bzw. TDP-43-codierenden Konstrukt (pCM190), sowie mit dem GFP-Atg8-Plasmid transformiert (siehe Abschnitt 3.7). Der Grad der Autophagie wurde unter nährstoffreichen Bedingungen (SMGalRD-Leu-Ura+Dox), nach ca. 16 Stunden Inkubation, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.10). Die Zellen, welche das Kontrollplasmid oder das TDP-43-codierende Konstrukt enthielten, zeigten keinen signifikant optischen Unterschied in Bezug auf die vakuoläre GFP-Prozessierung. In beiden Gruppen konnten Zellen mit nur punktförmigen Strukturen, ausschließlich vakuolärer Färbung oder mit beiden Merkmalen beobachtet werden (Abb. 22). Bei den punktuellen zytoplasmatischen Formen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Phagophoren oder Autophagosomen.

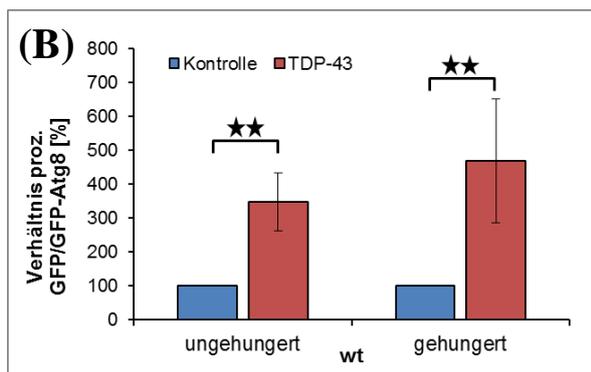
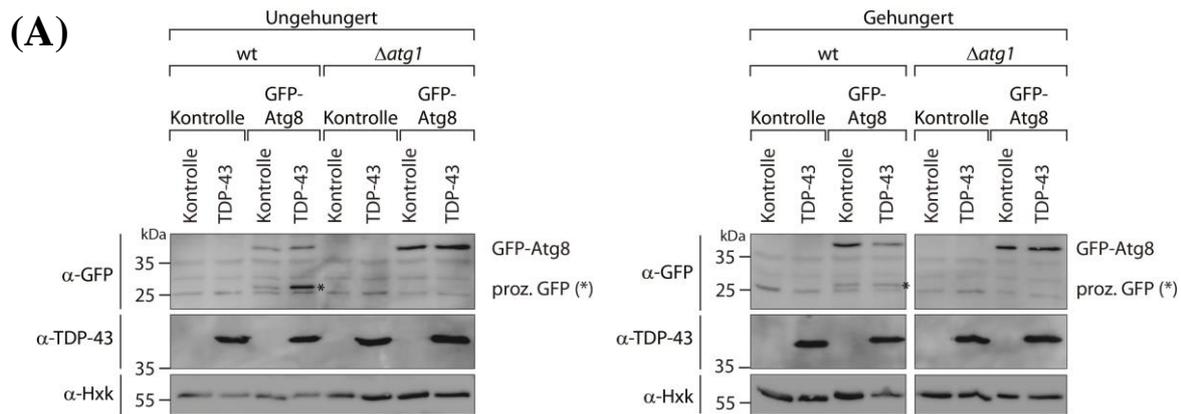
In einem weiteren Ansatz wurde neben dem wildtypischen Stamm auch der  $\Delta atg1$ -Deletionsstamm, in welchem die Autophagie blockiert ist, analysiert. Die Zellen wurden zunächst über Nacht in nährstoffreichem Medium (SMGalRD) inkubiert und anschließend in Hungermedium (SD-N) überführt (siehe Abschnitt 3.5.5). Die Kultivierung in nährstoffarmem Medium sollte die Autophagie forcieren. Die Auswertung der GFP-Abspaltung bei fortwährender TDP-43-Expression erfolgte mittels Western Blot (siehe Abschnitt 3.11 und 3.12). Während bei  $\Delta atg1$  ausschließlich das Volllängenfusionsprotein nachgewiesen werden konnte, fand beim wt-Stamm eine GFP-Prozessierung statt (Abb. 23). Freies GFP wurde sowohl unter Nicht-, als auch unter Hungerbedingungen nachgewiesen. Die GFP-Freisetzung beim Kontrollplasmid, während der Inkubation in nährstoffreichem Medium, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass über den Cvt-Weg (selektiver Weg der Autophagie) in geringem Umfang GFP-Atg8 zu GFP prozessiert wurde oder dass sich die



**Abb. 22: Schematische Darstellung und mikroskopische Auswertung des GFP-Atg8-Prozessierungsassays.**

(A) Während des autophagischen Prozesses werden überschüssige bzw. geschädigte Organellen und zytosolische Komponenten von der Phagosomenmembran umschlossen und in einem vollständigen Vesikel, dem Autophagosom, zur Vakuole transportiert. Durch die posttranslationale Lipidierung von Atg8 mit Phosphatidylethanolamin (PE) wird das markierte Fusionsprotein GFP-Atg8 in die Lipiddoppelmembran verankert und gelangt so mit der vesikulären Fracht in die Vakuole. Dort wird es gespalten. (B) Die Prozessierung von GFP-Atg8 zu GFP war mikroskopisch auf Grund der vakuolären Grünfärbung erkennbar. Die Vakuole wurde zusätzlich mit CMAC visualisiert. Ferner konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie Phagosomen oder Autophagosomen durch zytosolische Punkte in den Zellen identifiziert werden. Die wildtypischen Kulturen enthielten neben dem GFP-Atg8-codierenden Konstrukt ein Doxycyclin-regulierbares Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid. Die Expressionsdauer betrug ca. 16 Stunden in SMGalRD

Flüssigmedium. Ein mikroskopischer Unterschied zwischen den Kontroll- oder TDP-43-enthaltenden Wildtypzellen war nicht existent. Bei beiden Populationen konnten Zellen mit nur punktförmigen Strukturen (Bildreihe 3), ausschließlich vakuolärer Färbung (Bildreihe 2) oder mit beiden Merkmalen (Bildreihe 1) beobachtet werden. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .

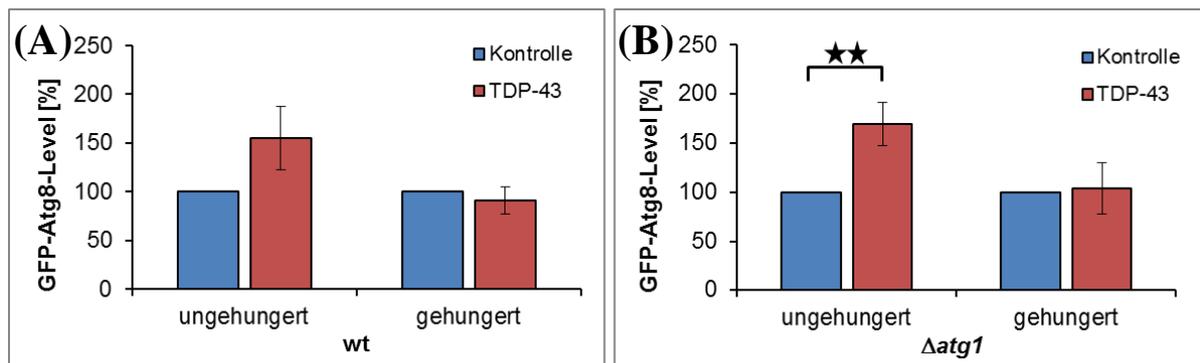


**Abb. 23: Bestimmung der Autophagierate mit Hilfe der Prozessierung von GFP-Atg8 zu GFP.** (A) Die wildtypischen und  $\Delta atg1$  Zellen, welche neben dem GFP-Atg8-codierenden Konstrukt ein Doxycyclin-regulierbares Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid enthielten, wurden nach ca. 16 Stunden im Expressionsmedium (SMGalRD) und nach mehreren Stunden im Hungermedium (SD-N) geerntet. Während bei  $\Delta atg1$  keine GFP-Freisetzung nachgewiesen werden konnte, zeigte der Wildtyp bei beiden

Nährstoffbedingungen eine Prozessierung von GFP-Atg8 zu GFP. Dieser wurde mit einem \* gekennzeichnet. Als Ladekontrolle diente die Hexokinase. (B) Quantifizierung des prozessierten GFP-Levels im wt wie in (A) beschrieben. Auf Grund der Expression von TDP-43 wurde vermehrt GFP-Atg8 zu GFP abgebaut. Diese Beobachtung war bei beiden Nährstoffbedingungen signifikant. Der Mittelwert berechnete sich aus fünf biologischen Klonen von drei unabhängigen Experimenten. Zusätzlich angegeben wurde. Fehlerbalken: Standardfehler; Mann-Whitney Rank Sum Test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

Zellen bereits in einem frühstationären Stadium befanden und Autophagie zur Nährstoff- und Energiegewinnung nutzten. Mit Hilfe des Western Blots konnte zu beiden Zeitpunkten ein statistisch signifikanter Anstieg an prozessiertem GFP während der Expression von TDP-43 nachgewiesen werden (Abb. 23). Dies ist ein Hinweis darauf, dass TDP-43 den Grad der Autophagie steigert.

Zusätzlich zum Autophagieprozess erfolgte die Quantifizierung des GFP-Atg8-Proteinlevels (Abb. 24). Im nährstoffreichen Zustand konnte eine Anreicherung des Fusionsproteins, sowohl im Wildtyp als auch in  $\Delta atg1$ , beobachtet werden. Allerdings war nur im Deletionsstamm die Anreicherung signifikant. Während des Hungerns konnten keine Unterschiede im Proteinlevel festgestellt werden. Da die Expression von GFP-Atg8 durch einen endogenen *ATG8*-Promotor kontrolliert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Anwesenheit von TDP-43 die Transkription autophagischer Gene zu einem Zeitpunkt induziert, in der normalerweise kaum Autophagie stattfindet.



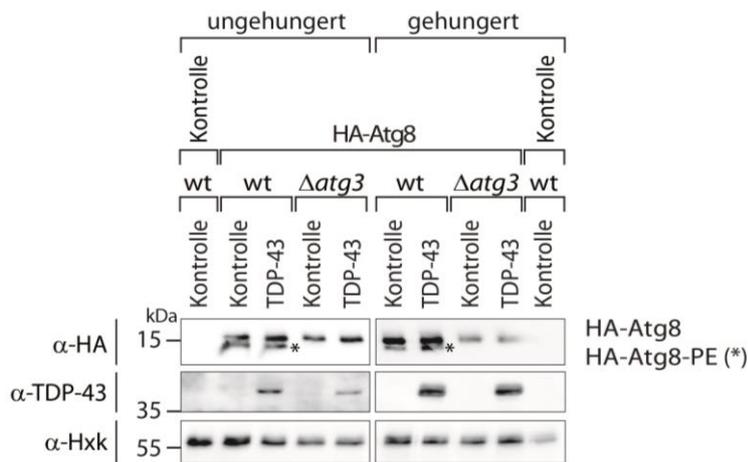
**Abb. 24: Bestimmung des GFP-Atg8-Levels im (A) Wildtyp und (B)  $\Delta atg1$ -Stamm.** Während der Kultivierung im nährstoffreichen Medium (SMGalRD) konnte bei beiden Stämmen eine Zunahme des GFP-Atg8-Levels bei der Expression von TDP-43 beobachtet werden. Bei  $\Delta atg1$  war diese signifikant. Im Hungerzustand (SD-N) war sowohl beim wt, als auch bei der Deletionsmutante kein Unterschied zwischen den Zellen mit Kontrollplasmid und TDP-43-exprimierenden Zellen hinsichtlich des GFP-Atg8-Levels erkennbar. Auf Grund des endogenen Promotors des für GFP-Atg8-codierenden Konstrukts kann vermutet werden, dass die Expression von TDP-43 frühzeitig die Autophagie induziert. Der Mittelwert berechnete sich aus fünf biologischen Klonen aus drei unabhängigen Experimenten. Standardfehler; Mann-Whitney Rank Sum Test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

In einem zweiten experimentellen Ansatz sollten die Resultate aus dem GFP-Atg8-Prozessierungsassays überprüft werden. Hierfür wurde die Lipidierung von Atg8 zu Atg8-PE untersucht. Die Konjugation von Atg8 ist ein essentielles Ereignis in der Reifung eines Autophagosoms. Hierbei wird Atg8 mit Hilfe der Atg-Proteine 4, 7 und 3 sowie durch den Atg12-Atg5-Atg16 E3-Komplex mit Phosphatidylethanolamin (PE) verknüpft und in die Phagophore eingebaut. Während die Abspaltung von GFP im GFP-Atg8-Versuch erst in der Vakuole stattfindet, ist das Einbinden von Atg8-PE in die Lipiddoppelmembranen ein früh stattfindendes Autophagieereignis (Abb. 22, Kirisako *et al.* 1999, 2000, Huang *et al.* 2000, Nair *et al.* 2012). Die Lipidierung von Atg8 mit PE wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem Wildtypstamm und in einer Negativkontrolle ( $\Delta atg3$ ) mittels Western Blot untersucht. Der Stamm  $\Delta atg3$  ist nicht in der Lage Atg8-PE zu synthetisieren. Für das Experiment erfolgte die Transformation beider Stämme mit einem Kontroll- bzw. TDP-43-codierenden Plasmid (pCM190) und einem HA-Atg8-codierenden Konstrukt (siehe Abschnitt 3.7). Das Atg8-PE-Level wurde unter nährstoffreichen (SMGalRD-Ura-Leu) und nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen bestimmt (Abb. 25).

Mit Hilfe des Western Blots konnte eine Atg8-Lipidierung sowohl in ungestungerten, frühstationären als auch in gehungerten Wildtypzellen beobachtet werden. Erwartungsgemäß war kein Atg8-PE im  $\Delta atg3$ -Stamm nachweisbar. Ferner kam es zu keiner sichtbar

gesteigerten Prozessierung von Atg8 während der TDP-43-Expression im Wildtyp. Eine Quantifizierung der Banden war auf Grund deren Nähe im Western Blot nicht möglich.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass das neurotoxische Protein TDP-43 keinen Einfluss auf die Lipidierung von Atg8 hat. Allerdings konnte eine frühzeitige Induktion der Autophagie und eine Steigerung des autophagischen Flusses beobachtet werden. Die Expression von TDP-43 verstärkte demnach den autophagischen Prozess.

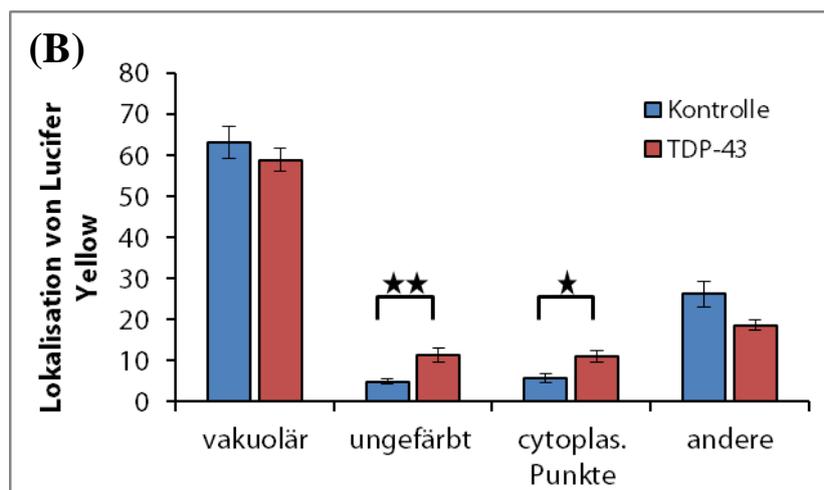
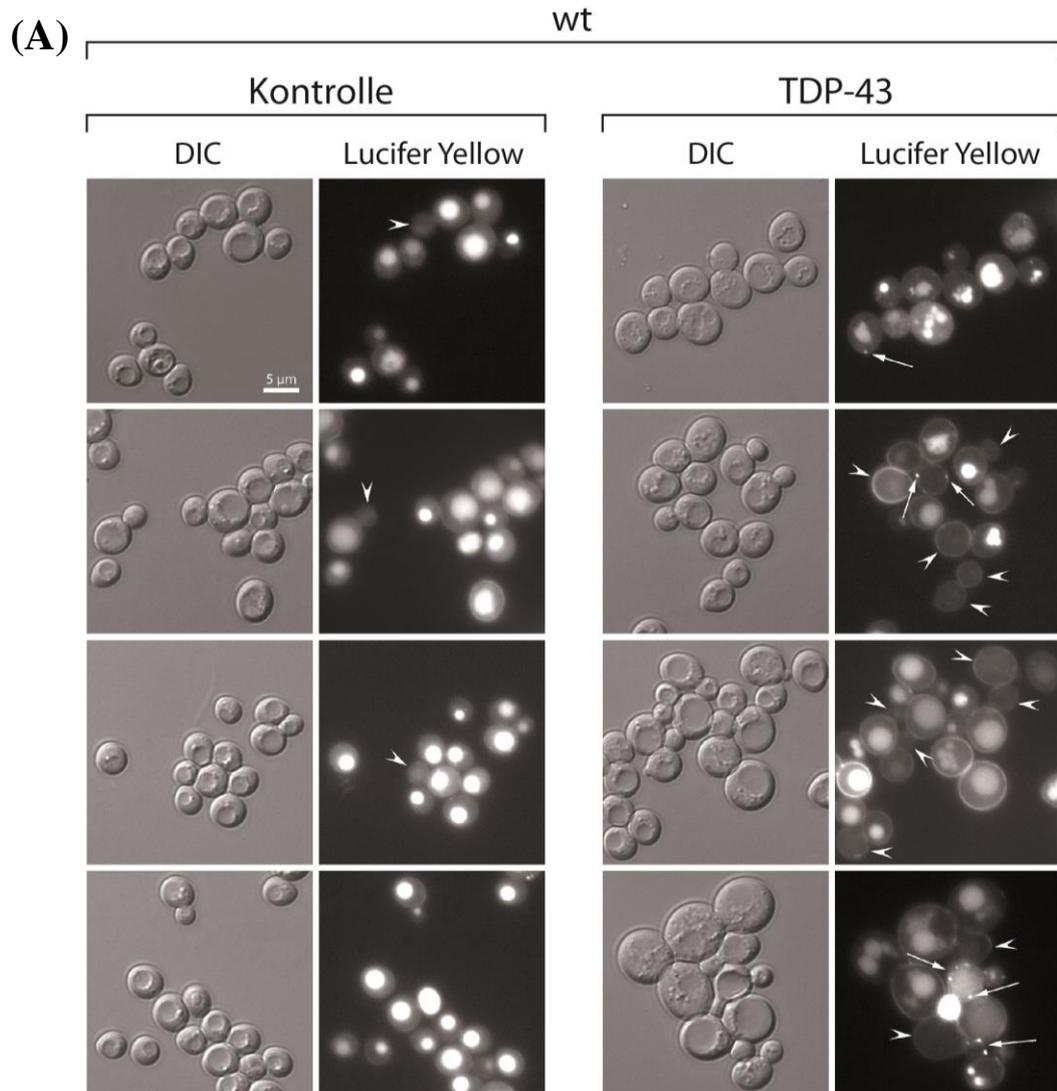


**Abb. 25: Bestimmung der Atg8-Lipidierung im wt und in  $\Delta atg3$ .** Beide Stämme enthielten ein HA-Atg8-codierendes Konstrukt und ein Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid. Auf Grund der Deletion von *ATG3* konnte keine Prozessierung von Atg8 mit PE beobachtet werden. Allerdings wurde im wt sowohl bei Nicht-hungerbedingungen (SMGalRD), als auch bei Hungerbedingungen (SD-N) eine post-translationale Modifikation von Atg8 zu

Atg8-PE festgestellt. Diese Prozessierung erfolgte bei Zellen mit einem Kontrollplasmid und einem TDP-43-codierenden Konstrukt. Ein optischer Unterschied im Grad der Atg8-Lipidierung war bei den Plasmiden nicht ersichtlich. Als Ladekontrolle diente die Hexokinase.

#### 4.2.3 Die TDP-43-Expression behindert die Endozytose und den MVB-Weg

Die Detektion pathophysiologischer Veränderungen auf Grund der Expression von TDP-43 erfolgte für die Endozytose mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow und dem Fusionsprotein Ste3-GFP. Die Einlagerung der Marker in die Vakuole führt zu einer mikroskopisch erkennbaren vakuolären Färbung. Ein funktioneller endozytotischer Prozess kann daher durch optische Analyse identifiziert werden. Für den Lucifer Yellow Assay wurden wildtypische Zellen mit einem Kontroll- oder TDP-43-Konstrukt (pCM190) transformiert (siehe Abschnitt 3.5.4 und 3.7) und in SMD-Ura Medium kultiviert. Die Kulturen wurden anschließend mit Lucifer Yellow behandelt und mittels Mikroskopie ausgewertet (siehe Abschnitt 3.10). In Abhängigkeit der Lokalisation des Farbstoffs erfolgte die Unterteilung der Zellen in vier Gruppen. Sie waren entweder vakuolär markiert, ungefärbt, besaßen zytoplasmatische Punkte oder anderweitige Färbungen (Abb. 26). Die Expression von TDP-43 führte zu einem signifikanten Anstieg der ungefärbten Zellen und der Zellen mit zytoplasmatischen Punkten (Abb. 26). Dies deutete auf eine Störung des endozytotischen Prozesses während der TDP-43-Expression hin.



**Abb. 26: Die Expression von TDP-43 stört die Endozytose.** (A) Wildtypische Zellen, die ein Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid exprimierten, wurden in Expressionsmedium (SMD-Ura) angezogen, mit Lucifer Yellow gefärbt und mikroskopiert. Eine funktionelle Endozytose war durch eine vakuoläre Färbung erkennbar (extrazelluläre Aufnahme von Lucifer Yellow durch Endozytose in die Vakuole). Lag eine Störung des Transports vor, so waren die Zellen ungefärbt (gekennzeichnet mit einer Pfeilspitze) oder sie wiesen zytoplasmatische Punkte auf (markiert mit einem Pfeil). Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der Zellen in Abhängigkeit der Lokalisation von Lucifer Yellow wie in (A) beschrieben. Die Expression von TDP-43 führte zu einer markanten Zunahme ungefärbter Zellen und Zellen mit zytoplasmatischen Punkten. Gezeigt wird der Mittelwert aus sechs biologischen Proben zweier unabhängiger Versuche. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

ung des Transports vor, so waren die Zellen ungefärbt (gekennzeichnet mit einer Pfeilspitze) oder sie wiesen zytoplasmatische Punkte auf (markiert mit einem Pfeil). Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der Zellen in Abhängigkeit der Lokalisation von Lucifer Yellow wie in (A) beschrieben. Die Expression von TDP-43 führte zu einer markanten Zunahme ungefärbter Zellen und Zellen mit zytoplasmatischen Punkten. Gezeigt wird der Mittelwert aus sechs biologischen Proben zweier unabhängiger Versuche. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

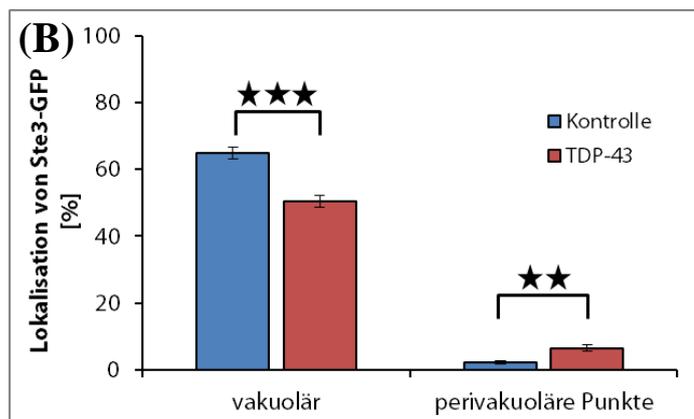
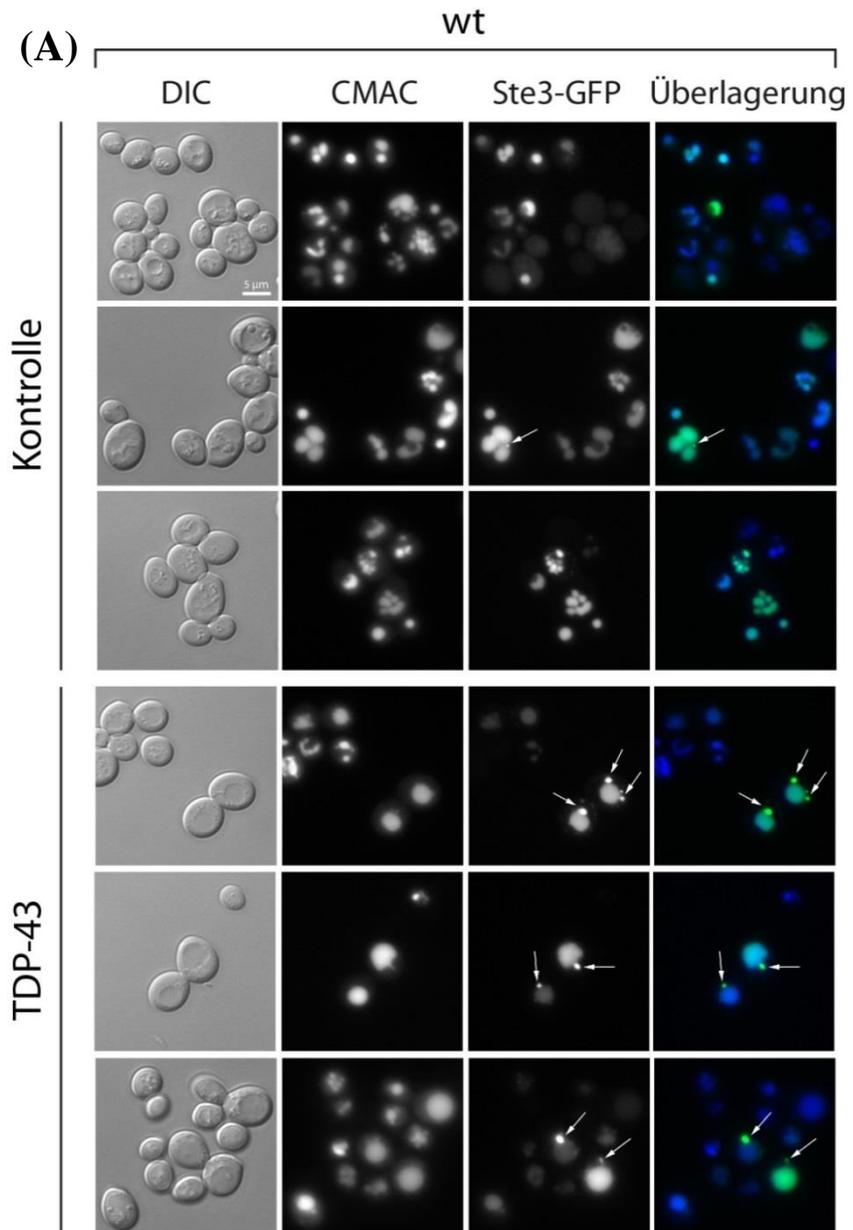
Neben der Färbung mit Lucifer Yellow wurde ein mit GFP-markierter Paarungspheromonrezeptor Ste3 zur Beobachtung der Endozytose eingesetzt (Bryant und Stevens 1998, Toret und Drubin 2006). Die Proteinsynthese erfolgt ausschließlich in  $\alpha$ -Zellen und dient der Kommunikation und Paarung der Zellen (Hagen *et al.* 1986). Der Ste3-Rezeptor ist in der Zelloberfläche verankert und wird nach der Bindung eines Liganden mittels Endozytose in die Vakuole transportiert (Bryant und Stevens 1998, Toret und Drubin 2006). Das Ste3-GFP-codierende Plasmid wurde zusammen mit einem Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt (pESC) in den Wildtyp und in den Deletionsstamm  $\Delta ccz1$  transformiert und mikroskopisch nach der Kultivierung in SMGal-Ura-His ausgewertet. Eine funktionelle Endozytose führt, auf Grund der vakuolären GFP-Prozessierung, zu einer Vakuolenfärbung. Bei einem gestörten Proteinweg kann Ste3-GFP nicht in die Vakuole aufgenommen werden und liegt peri-vakuolär im Zytoplasma vor (Wang *et al.* 2002). Eine solch fehlerhafte Endozytose konnte sowohl bei Wang *et al.* (2002) als auch in der hiesigen Arbeit im  $\Delta ccz1$ -Stamm beobachtet werden (siehe Anhang Abb. IX). Darüber hinaus zeigte ein geringer Teil der TDP-43-exprimierenden Wildtypzellen ein punktförmiges GFP-Signal (Abb. 27). Dieser lag signifikant höher als bei den Zellen mit einem Kontrollplasmid. Gleichzeitig konnte eine markante Abnahme der vakuolären Färbung der TDP-43-synthetisierenden Zellen gezeigt werden. Auch in diesem zweiten Experiment wurde eine Beeinträchtigung der Endozytose infolge einer Expression von TDP-43 beobachtet.

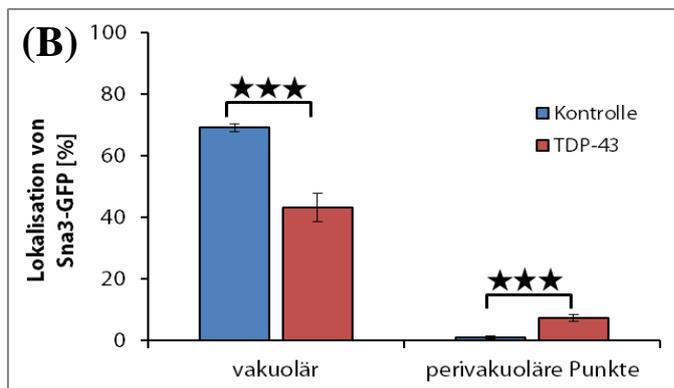
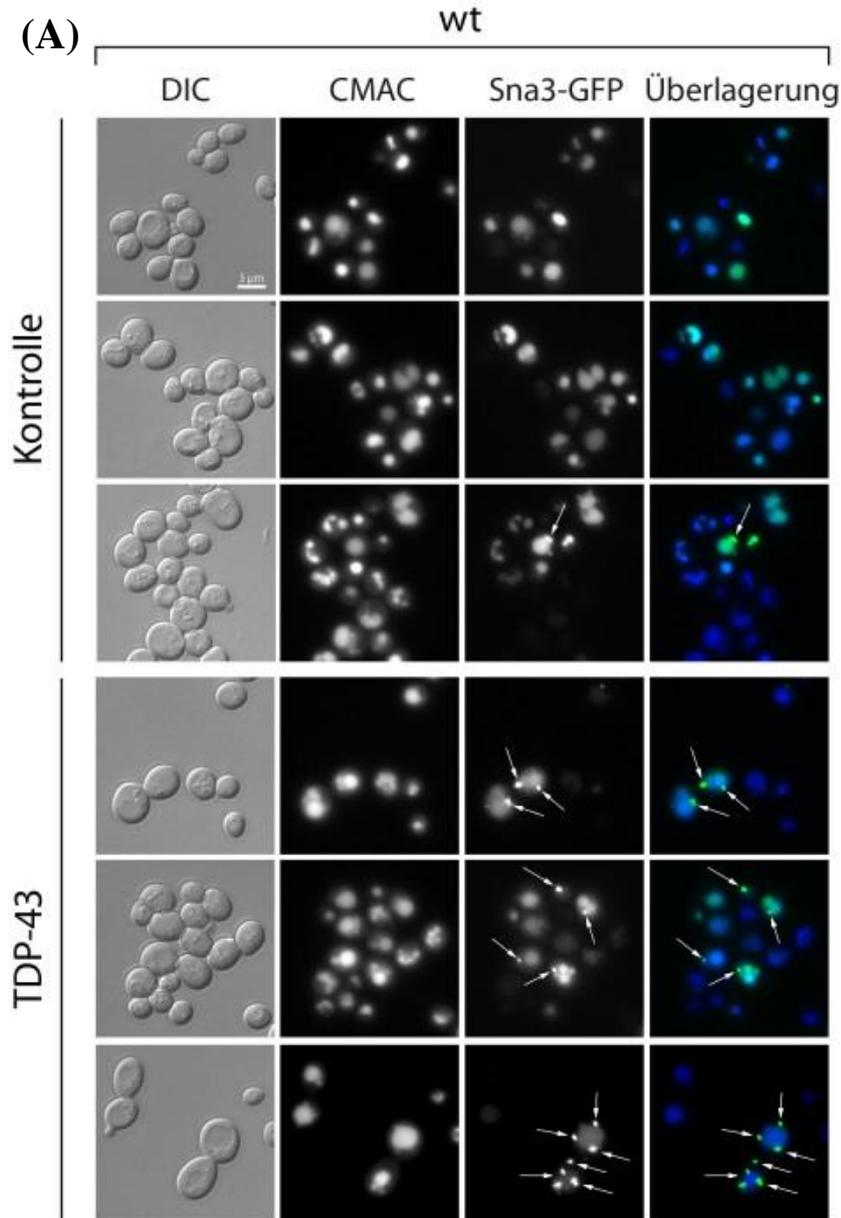
Die frühe Endozytose kann physiologisch im MVB-Weg münden. Dessen Aktivität wurde mit Hilfe des mit GFP-markierten Proteins Sna3 während der Expression eines Kontroll- oder TDP-43-codierenden Plasmids untersucht. Sna3-GFP ist ein gängiges Modells substrat für den MVB-Weg (Wang *et al.* 2002) und unterstützt die Sortierung anderer Proteine im MVB-Vesikel (MacDonald *et al.* 2012). Ebenso wie beim Endozytosemarker Ste3-GFP wird das Fusionsprotein Sna3-GFP in die Vakuole aufgenommen und das GFP-Protein abgespalten. Dadurch wird die Vakuole grün gefärbt. Ist die Bildung der MVBs oder deren Fusion mit der Vakuole gestört entsteht ein peri-vakuoläres Signal im Zytoplasma. Dieses Phänomen wurde in der Publikation von Wang *et al.* (2002) im  $\Delta ccz1$ -Stamm gezeigt und konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Anhang Abb. X). Neben dem Deletionsstamm wurde auch der Wildtyp analysiert. Während in den Hefen, welche das Kontrollplasmid (pESC) enthielten, nur wenige Zellen ein zytoplasmatisches Signal aufwiesen, zeigten die Zellen mit einem TDP-43-codierenden Konstrukt eine erhöhte Vesikelanzahl im Zytoplasma (Abb. 28). Ferner zeigten insgesamt weniger TDP-43-exprimierende Zellen ein vakuoläres

**Abb. 27: Die Expression von TDP-43 stört die Endozytose.**

**(A)** Die wildtypischen Zellen, welche entweder ein Kontroll- oder ein TDP-43-codierendes Plasmid und ein Ste3-GFP-codierendes Konstrukt enthielten, wurden für ca. 16 Std. in Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) angezogen. Der Paarungspheromonrezeptor Ste3-GFP wurde bei erfolgreicher Endozytose in die Vakuole aufgenommen und färbte diese grün. War der Transportprozess gestört entstanden peri-vakuoläre, zytoplasmatische Punkte (siehe Pfeile). Zellen mit einem TDP-43-codierenden Plasmid wiesen vermehrt punktförmige grünfluoreszierende Strukturen auf. Die Vakuolen wurden mit CMAC gefärbt. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .

**(B)** Quantifizierung der Ergebnisse aus **(A)**. Die TDP-43-Expression verursachte eine Reduktion der Zellen mit einer vakuolären Färbung und steigerte die Anzahl an peri-vakuolären Punkten. Es wurden sieben biologische Proben aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .



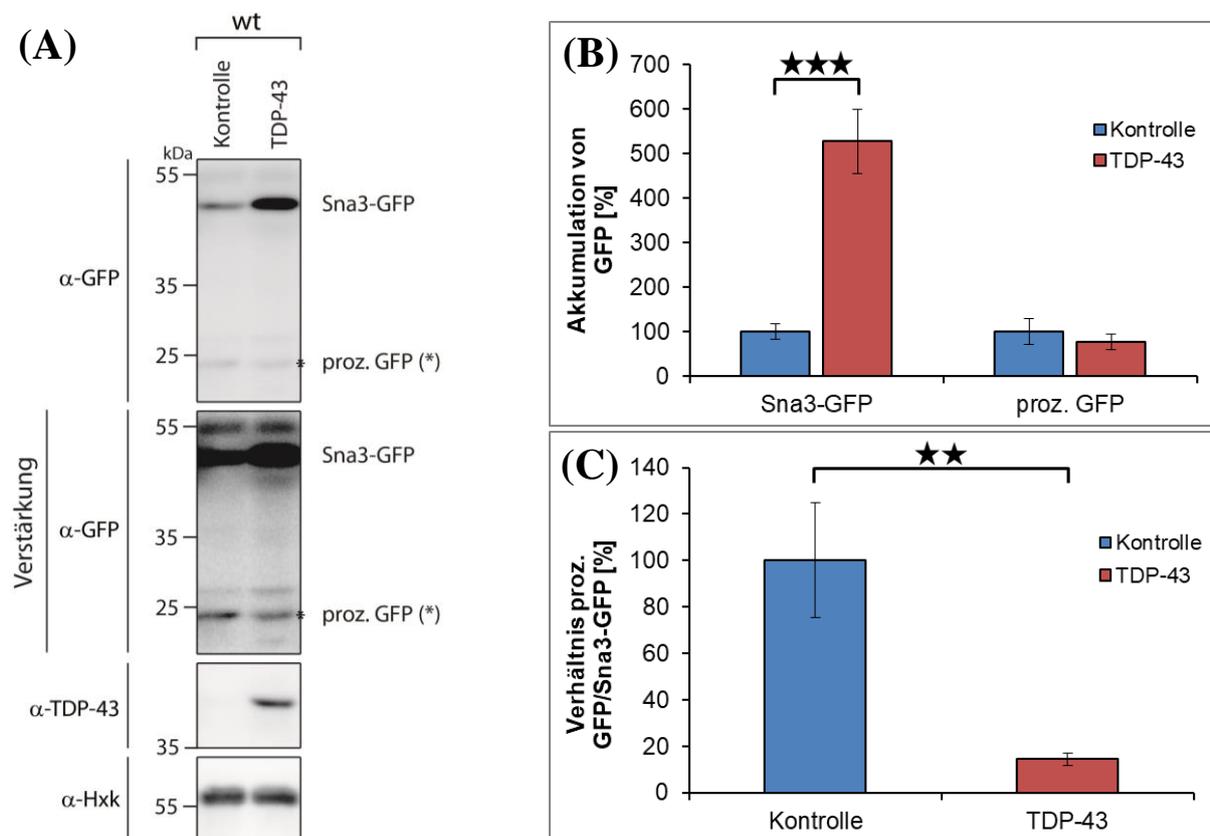


**Abb. 28: Die Expression von TDP-43 stört den MVB-Weg.** (A) Wildtypzellen enthielten ein Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid und ein Konstrukt, welches für das MVB-Substrat Sna3-GFP codierte. Die Zellen wurden über Nacht in Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) kultiviert und anschließend mikroskopiert. Das Fusionsprotein Sna3-GFP färbte die Vakuole grün, wenn dieses durch den MVB-Weg in das Organell transportiert und dort gespalten wurde.

Bei der Hemmung des vakuolären Abbauwegs entstanden in der Zelle peri-vakuoläre Punkte (markiert durch Pfeile). Die vakuoläre Färbung erfolgte mittels CMAC. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der Resultate aus (A). Auf Grund der TDP-43-Expression konnte eine Reduktion der Zellen mit einer vakuolären Färbung und eine Steigerung der Anzahl an peri-vakuolären Punkten beobachtet werden. Darstellt wurde der Mittelwert von sieben biologischen Proben aus drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

Signal im Vergleich zu Zellen mit einem Kontrollplasmid. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TDP-43 nicht nur die Endozytose, sondern auch den MVB-Weg beeinträchtigt.

In einem weiteren Experiment sollte die Prozessierung von Sna3-GFP während der TDP-43-Expression biochemisch mittels Western Blot untersucht werden. Die analysierten Wildtypzellen enthielten ein Kontroll- bzw. TDP-43-codierendes Konstrukt (pESC) und ein Sna3-GFP-codierendes Plasmid. Die Kulturen wurden nach ca. 16 Stunden im Expressionsmedium (SMD-Ura-His) geerntet, aufgeschlossen und für den Western Blot präpariert (siehe Abschnitt 3.5.6, 3.11 und 3.12). Die Auswertung zeigte eine signifikante zelluläre Akkumulation des Fusionsproteins Sna3-GFP und eine stark reduzierte GFP-Umsetzung in den TDP-43-exprimierenden Zellen (Abb. 29).



**Abb. 29: Die Expression von TDP-43 hemmt die Prozessierung des MVB-Substrats Sna3-GFP.** (A) Wildtypische Zellen enthielten ein Kontroll- oder TDP-43-codierendes Plasmid und ein Konstrukt, welches für das MVB-Substrat Sna3-GFP codierte. Die Zellen wurden über Nacht in Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) kultiviert und anschließend für die Western Blot Analyse geerntet und aufgeschlossen. Während die Zellen, die ein Kontrollplasmid enthielten, ein ähnliches Level an Sna3-GFP und GFP (markiert mit einem \*) aufwiesen, führte die TDP-43-Expression zu einer Anreicherung von nichtprozessiertem Sna3. Als Ladekontrolle diente die Hexokinase. (B)+(C) Quantifizierung des GFP-Levels von Sna3-GFP und freiem GFP wie in (A) beschrieben. Ferner wurde das Verhältnis prozessiertes GFP zu Sna3-GFP ermittelt. Das exprimierte TDP-43 führte zu einer signifikanten Zunahme an Sna3-GFP und zu einer Reduzierung der Prozessierung von Sna3-GFP zu GFP. Gezeigt ist der Mittelwert von fünf biologischen Klonen aus einem Experiment. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

Folglich konnten die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen durch den Western Blot untermauert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TDP-43 die vakuoläre Fragmentierung induziert, die Autophagie frühzeitig auslöst, den autophagischen Prozess steigert und den gesamten endosomal-vakuolären Prozess, also die Endozytose und den MVB-Weg, stört.

### 4.3 Die Bedeutung zellulärer Abbauwege beim Entfernen von TDP-43

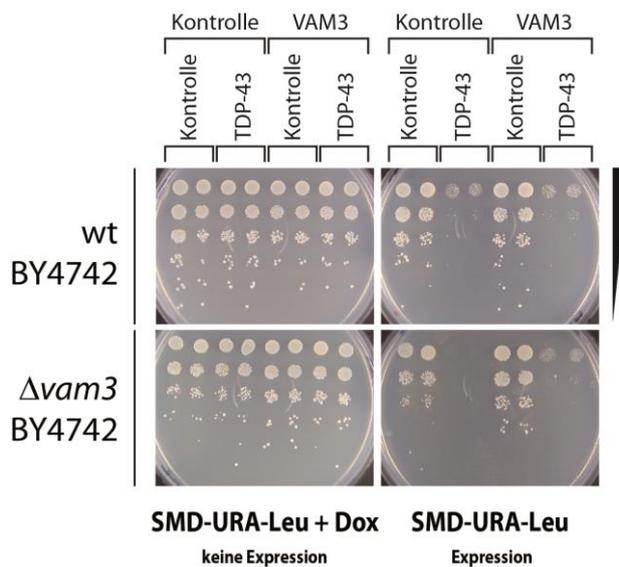
Mit Hilfe der bisherigen Resultate konnte gezeigt werden, dass eine gestörte Vakuolenfusion, ein beeinträchtigter endosomal-vakuolärer Prozess und ein reduziertes UPS die TDP-43-verursachte Zytotoxizität steigern. Andererseits wurden während der Expression von TDP-43 eine pathophysiologische Vakuolenmorphologie und ein fehlerhafter Endozytose- und MVB-Verlauf nachgewiesen. Hingegen ist die Beteiligung der Autophagie bei der TDP-43-bedingten Toxizität nicht eindeutig. Zum einen scheint die Autophagie bei der Detoxifizierung von TDP-43 keine eindeutige Rolle zu spielen. Zum anderen wird durch die TDP-43-Expression die Autophagie ungewöhnlich zeitig induziert und der Prozess insgesamt beschleunigt.

Es wurden verschiedene Proteinabbauwege (Autophagie, UPS, endosomal-vakuolärer Prozess) und die zelluläre Vakuolenfusion auf ihre Beteiligung am TDP-43 Eliminierungsprozess untersucht. Es sollte ermittelt werden, ob TDP-43 ein Substrat von einem oder mehreren Auflösungsprozessen ist und welche Rolle die vakuoläre Verschmelzung hierbei spielt.

#### 4.3.1 Eine gestörte Vakuolenfusion führt zu einer Anreicherung von TDP-43

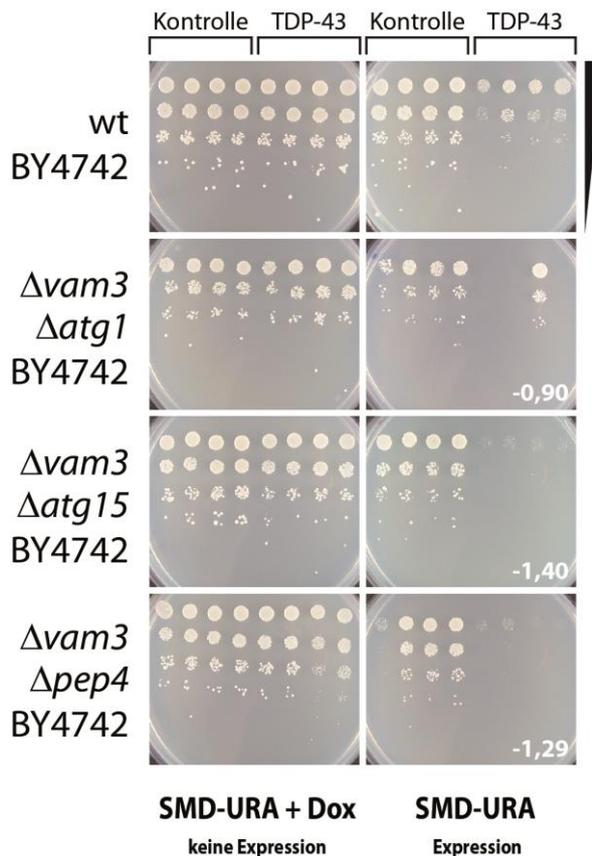
Im Tüpfeltestscreen wurde bei verschiedenen deletierten vakuolären Fusionsmutanten eine verstärkte Reduktion des Zellwachstums bei Expression von TDP-43 nachgewiesen. Einer dieser Deletionsstämme war  $\Delta vam3$ . Das SNARE-Protein Vam3 wird in beiden vakuolären Fusionstypen (homo- und heterotypisch) benötigt und ist für eine funktionierende Verschmelzung unerlässlich (Darsow *et al.* 1997). Das Wachstumsdefizit bei  $\Delta vam3$ , während der TDP-43-Expression, konnte teilweise in einem Komplementationsassay aufgehoben werden (Abb. 30). Hierfür wurden der Wildtyp und der  $\Delta vam3$ -Stamm mit einem Plasmid für Vam3 und TDP-43 transformiert und getüpfelt (siehe Abschnitt 3.5.3, 3.7 und 3.8). Im Wildtypstamm konnte kein Wachstumsunterschied zwischen der Kontrolle und

Vam3 bei TDP-43-Expression festgestellt werden. Jedoch war das TDP-43-bedingte Wachstumsdefizit in  $\Delta vam3$  leicht reduziert, wenn dieser gleichzeitig Vam3 exprimiert. Diese Daten unterstützen die Vorstellung, dass eine funktionierende Vakuolenfusionsmaschinerie für die Minderung der TDP-43-Toxizität benötigt wird.



**Abb. 30: Die Expression von Vam3 mildert den TDP-43-verursachten Wachstumsdefekt.** Wt und  $\Delta vam3$ -Zellen wurden mit zwei Plasmiden in vier verschiedenen Kombinationen transformiert, auf Nicht-expressions- und Expressionsplatten (SMD-Ura-Leu+/-Dox) getüpfelt und nach drei Inkubationstagen ausgewertet. Die Expression von TDP-43 führte in beiden Stämmen zu einer Wachstumsreduktion, welche bei  $\Delta vam3$  deutlicher ausgeprägt war als im wt. Die zeitgleiche Expression von Vam3 führte beim Deletionsstamm zu einer leichten Minderung der TDP-43-bedingten Zytotoxizität.

Ein weiterer experimenteller Ansatz sollte Einblick darüber geben, ob die Autophagie möglicherweise doch an der TDP-43-bedingten Zytotoxizität beteiligt oder ob die Vakuolenfusion für diese verantwortlich ist. Hierfür wurden der Wildtyp und die Deletionsstämme  $\Delta atg1$ ,  $\Delta atg15$ ,  $\Delta pep4$ ,  $\Delta vam3$ ,  $\Delta vam3\Delta atg1$ ,  $\Delta vam3\Delta atg15$  und  $\Delta vam3\Delta pep4$  untersucht. Atg1 ist ein Protein, welches zu Beginn der Autophagie benötigt wird und bei Deletion im Tüpfeltest keinen Unterschied im Wachstum gegenüber dem Wildtyp zeigte (siehe Abschnitt 4.1.4). Atg1 kommt vor Vam3 zum Einsatz, welches erst bei der Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole rekrutiert wird. Der Doppeldeletionsstamm  $\Delta vam3\Delta atg1$  sollte sich dementsprechend wie  $\Delta atg1$  verhalten, wenn nicht die vakuoläre Fusion die entscheidende Rolle spielt. Die Protease Pep4 und Lipase Atg15 hingegen werden erst in der Vakuole benötigt und sind dem Vakuolenfusionsprotein Vam3 untergeordnet. Daher müssten die Doppeldeletionsstämme  $\Delta vam3\Delta pep4$  und  $\Delta vam3\Delta atg15$  eine gesteigerte TDP-43-Zytotoxizität, ähnlich  $\Delta vam3$ , aufweisen. Mit Hilfe des Tüpfeltests konnte bei allen Doppeldeletionsstämmen ein ähnliches Wuchsverhalten wie beim  $\Delta vam3$ -Stamm nachgewiesen werden (Abb. 31). Dies lässt vermuten, dass die Vakuolenfusion und nicht die Autophagie einen starken Einfluss auf die TDP-43-verursachte Zytotoxizität ausübt.

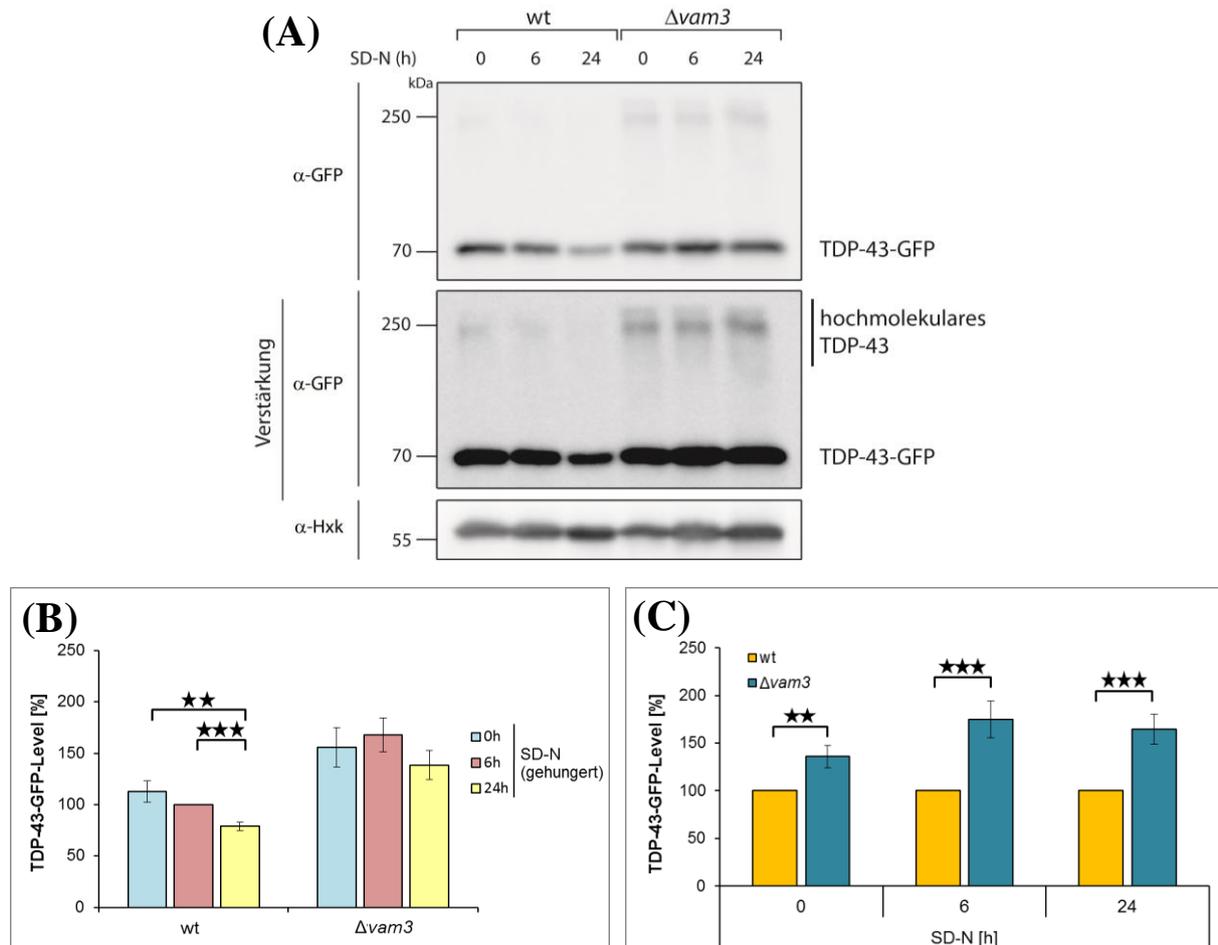


**Abb. 31: Die TDP-43-bedingte Zytotoxizität steigt bei einer gestörten Vakuolenfusion.** Die Doppeldeletionsstämme wurden mit einem Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert, auf Nichtexpressions- und Expressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) getüpfelt und nach drei Tagen ausgewertet. Bei allen Deletionsstämmen konnte eine stark erhöhte, durch TDP-43-Expression verursachte, Toxizität im Vergleich zum wt nachgewiesen werden. Der Wachstumsindex betrug bei  $\Delta vam3 \Delta atg1$  -0,9, bei  $\Delta vam3 \Delta atg15$  -1,40 und bei  $\Delta vam3 \Delta pep4$  -1,29. Dieses Wachstumsdefizit war ähnlich dem Deletionsstamm  $\Delta vam3$  mit -0,74 (siehe Abschnitt 4.1.4).

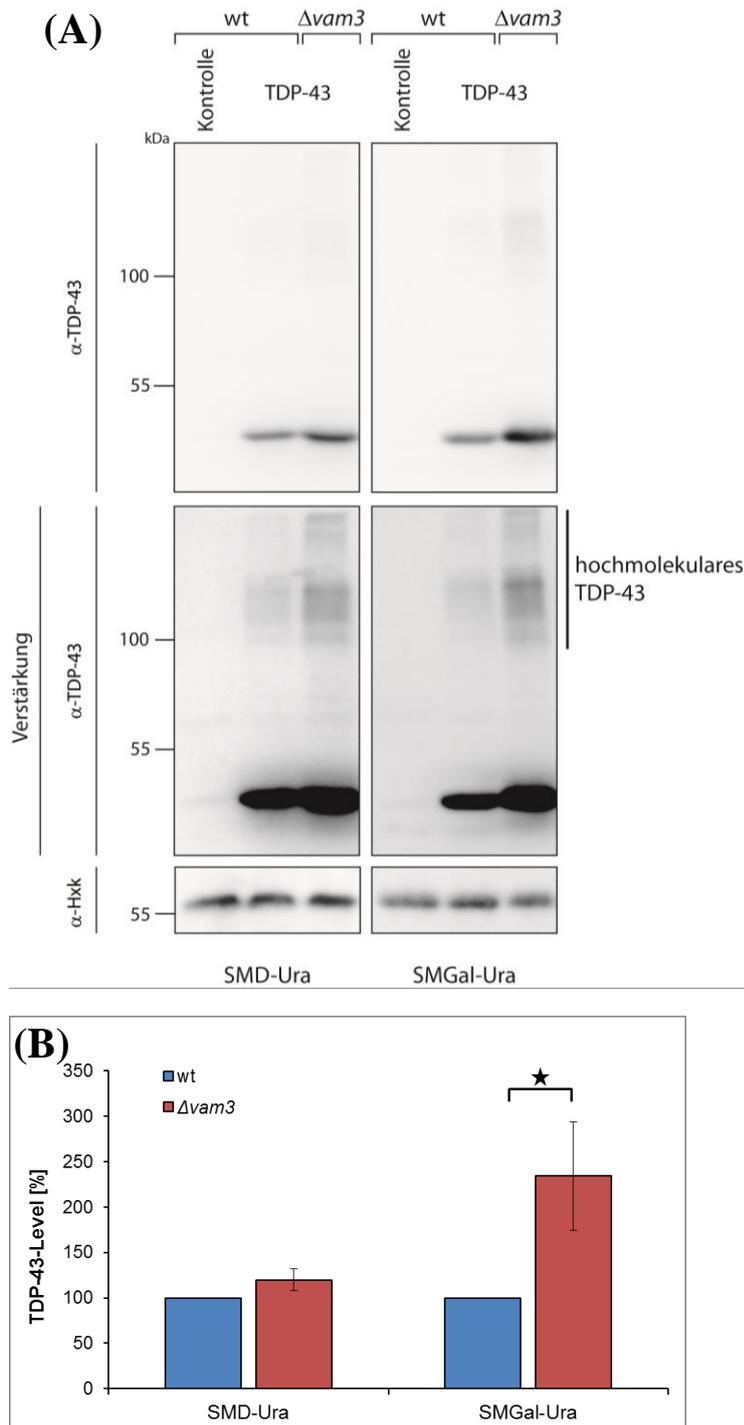
Ob die verstärkte Toxizität von  $\Delta vam3$  auf ein gesteigertes TDP-43-Level bzw. auf eine vermehrte Anzahl an TDP-43-Aggregaten zurückzuführen ist, sollte in den nächsten Experimenten analysiert werden. Mit Hilfe des Western Blots wurde das TDP-43-GFP-Niveau (pUG35) im Wildtyp und im  $\Delta vam3$ -Stamm bei Expressionsbedingungen bestimmt. Die Kulturen wurden in einer frühstationären Phase ( $t=0$ ) und nach sechs bzw. 24 Stunden Hungern geerntet und biochemisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.5.5, 3.11 und 3.12). Während der Hungerperiode konnte beim Wildtyp eine Abnahme des TDP-43-GFP-Niveaus festgestellt werden (Abb. 32). Im Gegensatz dazu war das Niveau bei  $\Delta vam3$  über die gesamte Zeit relativ konstant. Ferner zeigte der Deletionsstamm zu allen Messpunkten ein höheres TDP-43-GFP-Niveau als der wt. Besonders auffällig war die Anreicherung von SDS-unlöslichen hochmolekularen TDP-43-GFP-Spezies im  $\Delta vam3$ -Deletionsstamm. Diese war im Wildtyp kaum sichtbar. Übereinstimmend zu den bisherigen Ergebnissen konnte eine Akkumulation von nichtmarkiertem TDP-43 (pCM190) im  $\Delta vam3$ -Deletionsstamm beobachtet werden (Abb. 33). Untersucht wurden der Wildtyp und der Deletionsstamm aus einer frühstationären Glukose- oder Galaktose-haltigen Kultur. Zusätzlich zur Anreicherung von normalem und hochmolekularem TDP-43 in  $\Delta vam3$  konnte eine verstärkte Akkumulation

im Expressionsmedium mit Galaktose festgestellt werden. Zusammengefasst lassen diese Resultate vermuten, dass die vakuoläre Fusion an der Entfernung von TDP-43 beteiligt ist.

Neben dem  $\Delta vam3$ -Deletionsstamm wurden auch dessen Doppeldeletionsstämme fluoreszenzmikroskopisch und biochemisch auf ihr TDP-43-GFP-Niveau analysiert. Die Kultivierung der mit dem TDP-43-GFP-Konstrukt (pUG35) transformierten Zellen erfolgte



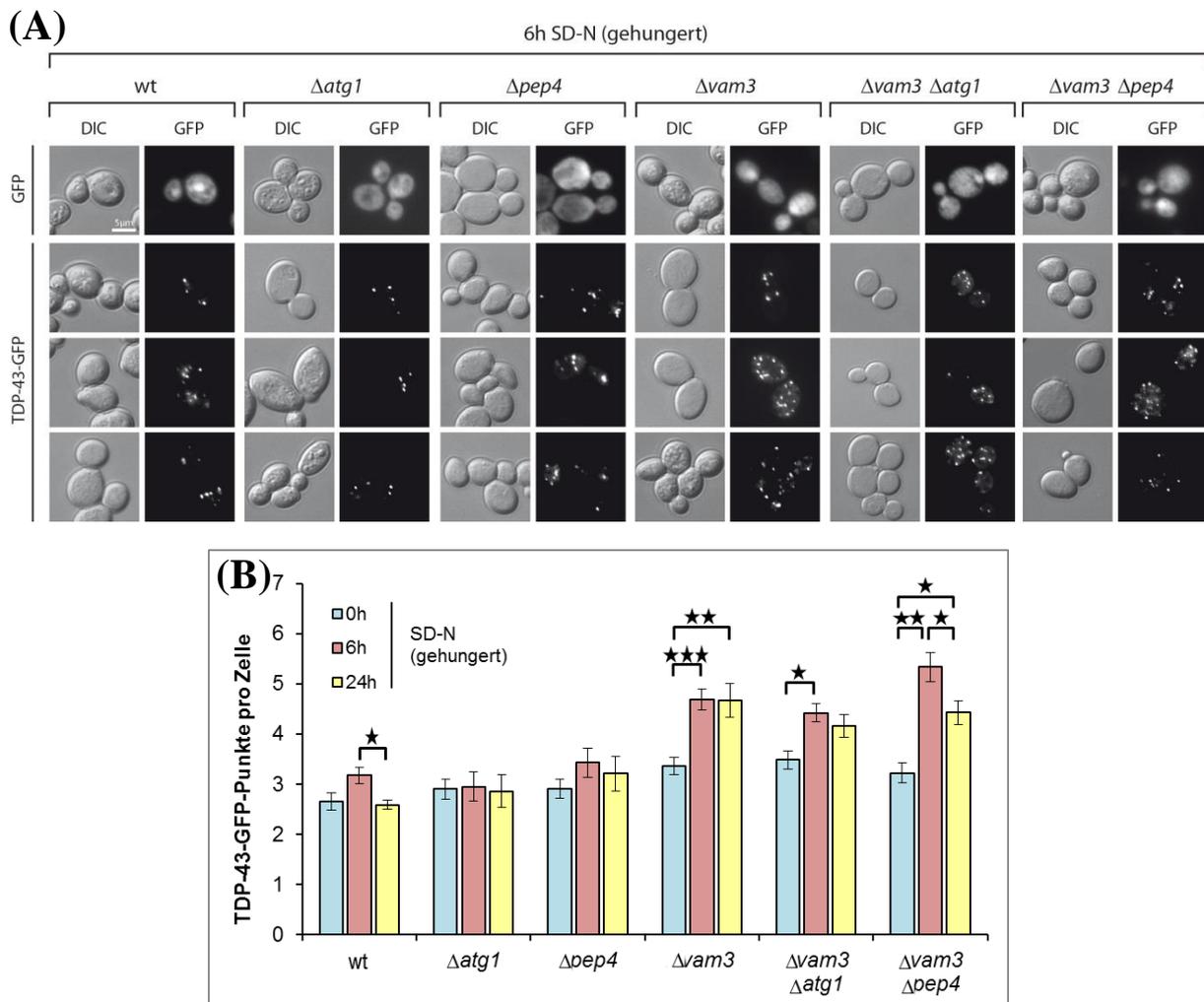
**Abb. 32: Die Hemmung der Vakuolenfusion führt zu einer Anreicherung von TDP-43-GFP.** (A) Wildtypische und  $\Delta vam3$ -Zellen, welche TDP-43-GFP exprimierten, wurden unter nährstoffreichen (SMD-Ura) und nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen analysiert. Während beim wt eine Abnahme des TDP-43-GFP-Niveaus über die Zeit erkennbar war, blieb das Level bei  $\Delta vam3$  relativ konstant. Ferner konnte in diesem Stamm hochmolekulares SDS-unlösliches TDP-43 nachgewiesen werden. (B) Quantifizierung des TDP-43-GFP-Niveaus aus (A). Gezeigt wird der signifikante Abbau von TDP-43-GFP beim wt, welcher aus 17 Proben ermittelt wurde und das relativ konstante Proteinlevel bei  $\Delta vam3$ , dass sich aus 12 biologischen Proben berechnete. Bei beiden Stämmen wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt. (C) Quantifizierung des TDP-43-GFP-Levels aus (A). Das Niveau an TDP-43-GFP war im Deletionsstamm zu allen Zeitpunkten, im Vergleich zum normalisierten wt, signifikant erhöht. Der Mittelwert ergab sich aus 15 biologischen Proben aus fünf unabhängigen Experimenten. (B)+(C) Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abb. 33: Bestimmung des TDP-43-Levels im wt und im  $\Delta vam3$ -Stamm während der Kultivierung in verschiedenen Medien.** (A) Beide Stämme wurden mit einem Doxycyclin-induzierbaren Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert und nach ca. 16 Stunden im Expressionsmedium (SMD-Ura oder SMGal-Ura) geerntet. Beim Deletionsstamm konnte eine Steigerung des TDP-43-Niveaus, sowohl bei der Expression im Glukose-, als auch im Galaktosemedium festgestellt werden. Ferner zeigte der  $\Delta vam3$ -Stamm eine Anreicherung von hochmolekularem TDP-43. (B) Quantifizierung des TDP-43-Levels aus (A). Die Akkumulation von TDP-43 war im Deletionsstamm bei Galaktosehaltigem Medium statistisch signifikant gesteigert. Der Mittelwert berechnete sich aus sechs biologischen Proben zweier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

für beide Untersuchungsmethoden zunächst über Nacht in nährstoffreichem Expressionsmedium (SMD-Ura). Nach ca. 16 Stunden wurde ein Teil der frühstationären Kultur geerntet. Der Rest wurde in stickstoffarmes Medium (SD-N) bei anhaltender TDP-43-Expression überführt und für sechs bzw. 24 Stunden gehungert (siehe Abschnitt 3.5.5). In Übereinstimmung mit den bisherigen Daten konnten in der Fluoreszenzmikroskopie für  $\Delta vam3$  mehr TDP-43-GFP-Aggregate während des Hungerns (sechs und 24 Stunden) gezählt

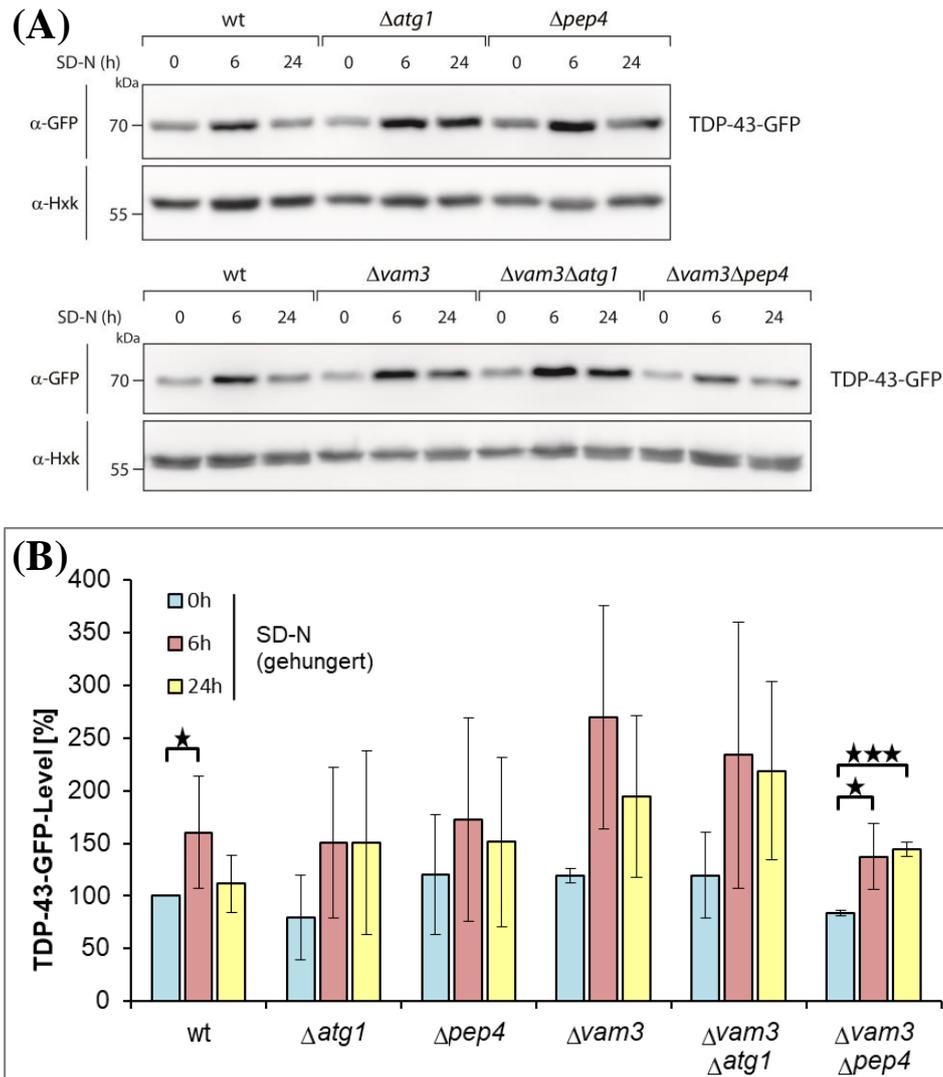
werden, als im wt (Abb. 34 und Anhang Abb. XI). Auch  $\Delta vam3\Delta atg1$  und  $\Delta vam3\Delta pep4$  wiesen signifikant mehr TDP-43-GFP-Punkte auf. Im Gegensatz dazu besaßen  $\Delta atg1$  und  $\Delta pep4$  im Vergleich zum Wildtyp ähnlich viele TDP-43-GFP-Aggregate.



**Abb. 34: Die Hemmung der Vakuolenfusion steigert die Anzahl der TDP-43-GFP-Aggregate.** (A) Die wildtypischen,  $\Delta atg1$ ,  $\Delta pep4$ ,  $\Delta vam3$ ,  $\Delta vam3\Delta atg1$  und  $\Delta vam3\Delta pep4$  Zellen, welche eine GFP-markierte Kontrolle oder TDP-43-GFP exprimierten, wurden während nährstoffreichen (SMD-Ura) und nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen kultiviert und mikroskopiert. Exemplarisch zeigt der Überblick in (A) die Anzahl der TDP-43-GFP-Punkte in den Zellen nach sechs Stunden Hungern (andere Zeitpunkte sind im Anhang Abb. XI zu finden). (B) Quantifizierung der TDP-43-GFP-Punkte pro Zelle, wie in (A) beschrieben. Eine Zunahme der TDP-43-GFP-Punkte konnte bei den Stämmen  $\Delta vam3$ ,  $\Delta vam3\Delta atg1$  und  $\Delta vam3\Delta pep4$  beobachtet werden. Der Mittelwert berechnete sich aus sechs biologischen Proben zweier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

Parallel zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben mittels Western Blot untersucht. Anders als bei den vorherigen Analysen war das TDP-43-GFP-Level der einzelnen Klone sehr unterschiedlich (Abb. 35). Ferner muss beachtet werden, dass hochmolekulares TDP-43 nicht in die Quantifizierung einbezogen wurde. Auf Grund der großen Schwankungen ist eine

eindeutige Aussage über das zelluläre TDP-43-GFP-Level schwierig. Tendenziell besaßen die Deletionsstämme  $\Delta atg1$  und  $\Delta pep4$  ein ähnliches TDP-43-GFP-Niveau wie der Wildtyp. Der Deletionsstamm  $\Delta vam3$  zeigte, konform zu den anderen Experimenten, eine starke TDP-43-GFP-Anreicherung nach sechs Stunden Hungern. Diese nahm nach 24 Stunden wieder ab. Die Abreicherung war in den anderen Western Blot Analysen ebenfalls, wenn auch nicht so deutlich, zu erkennen. Auch der Doppeldeletionsstamm  $\Delta vam3\Delta atg1$  zeigte ein

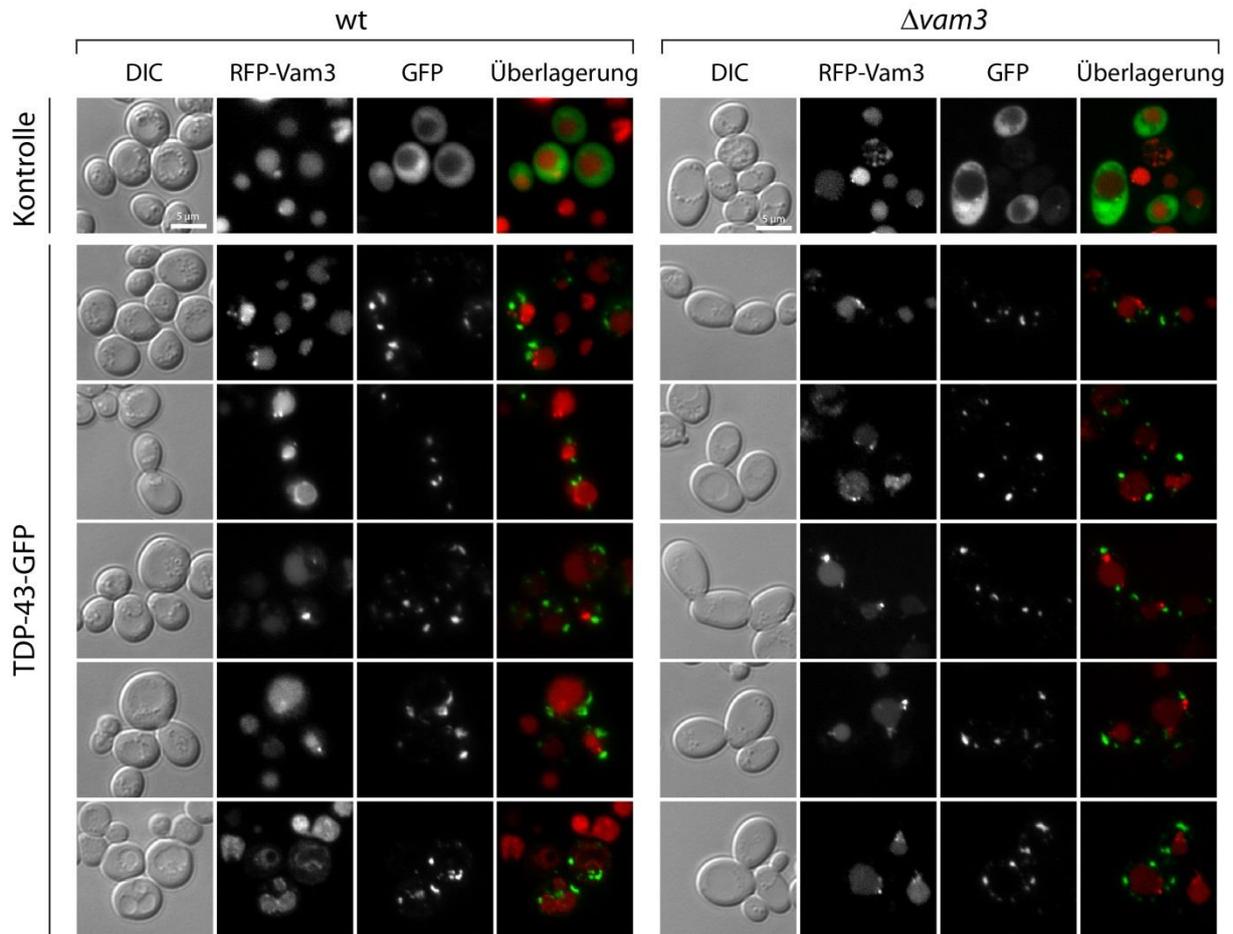


**Abb. 35: Die Störung der vakuolären Fusion führt zur Steigerung des zellulären TDP-43-GFP-Levels.** (A) Die Zellkulturen vom wt,  $\Delta atg1$ ,  $\Delta pep4$ ,  $\Delta vam3$ ,  $\Delta vam3\Delta atg1$  und  $\Delta vam3\Delta pep4$ , welche eine GFP-markierte Kontrolle oder TDP-43-GFP exprimierten, wurden während nährstoffreichen (SMD-Ura) und nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen kultiviert, geerntet, aufgeschlossen und per Western Blot untersucht. Optisch konnte bei allen Stämmen ein Anstieg des TDP-43-GFP-Niveaus nach sechs Stunden und eine Stabilisierung nach 24 Stunden Hungern beobachtet werden. (B) Quantifizierung des TDP-43-GFP-Levels aus (A). Der Mittelwert des Proteinlevels errechnete sich aus sechs biologischen Proben für den wt und drei Proben für die Deletionsstämme aus einem Experiment. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

vergleichsweise hohes TDP-43-GFP-Niveau nach sechs und 24 Stunden Hungern. Erstaunlicherweise lag  $\Delta vam3\Delta pep4$  auf einem Level mit dem Wildtyp,  $\Delta atg1$  und  $\Delta pep4$ . Ursache hierfür könnte möglicherweise eine zu geringe TDP-43-GFP-exprimierende Zellpopulation sein. Unabhängig davon, zeigte der Doppeldeletionsstamm während der Hungerperiode eine signifikante Zunahme des TDP-43-GFP-Levels. Zur Validierung der vorliegenden Ergebnisse sollte das Experiment allerdings wiederholt werden.

Nimmt man die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und der Western Blot Analyse zusammen, so konnte während der Kultivierung im nährstoffarmen Medium eine mehr oder minder starke TDP-43-GFP-Anreicherung in den Stämmen  $\Delta vam3$ ,  $\Delta vam3\Delta atg1$  und  $\Delta vam3\Delta pep4$  beobachtet werden. Bei den Autophagie-relevanten Deletionsstämmen  $\Delta atg1$  und  $\Delta pep4$  konnte hingegen keine Zunahme der TDP-43-GFP-Aggregate bzw. des TDP-43-GFP-Levels festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass die Vakuolenfusion, aber nicht die Autophagie, die Akkumulation von toxischem TDP-43 verhindert.

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob TDP-43 mit einer Komponente der Vakuolenmaschinerie direkt interagiert. Für dieses Experiment wurde der Wildtyp und  $\Delta vam3$  mit einem Kontroll-GFP- oder TDP-43-GFP-codierenden Konstrukt (pAG423) zusammen mit dem RFP-Vam3-codierenden Plasmid transformiert (siehe Abschnitt 3.7). Die Zellen wurden über Nacht in Expressionsmedium (SMGal+Leu+Lys) kultiviert und anschließend mikroskopiert (siehe Abschnitt 3.5.6 und 3.10). Weder im wildtypischen, noch im deletierten Stamm konnte eine Kolo-kalisation der fluoreszenzmarkierten Proteine gefunden werden (Abb. 36). Anhand der Daten lässt sich mutmaßen, dass die Vakuolenmaschinerie für das Entfernen von zytotoxischem TDP-43 benötigt wird, allerdings nicht direkt (und dauerhaft) mit TDP-43 interagiert.



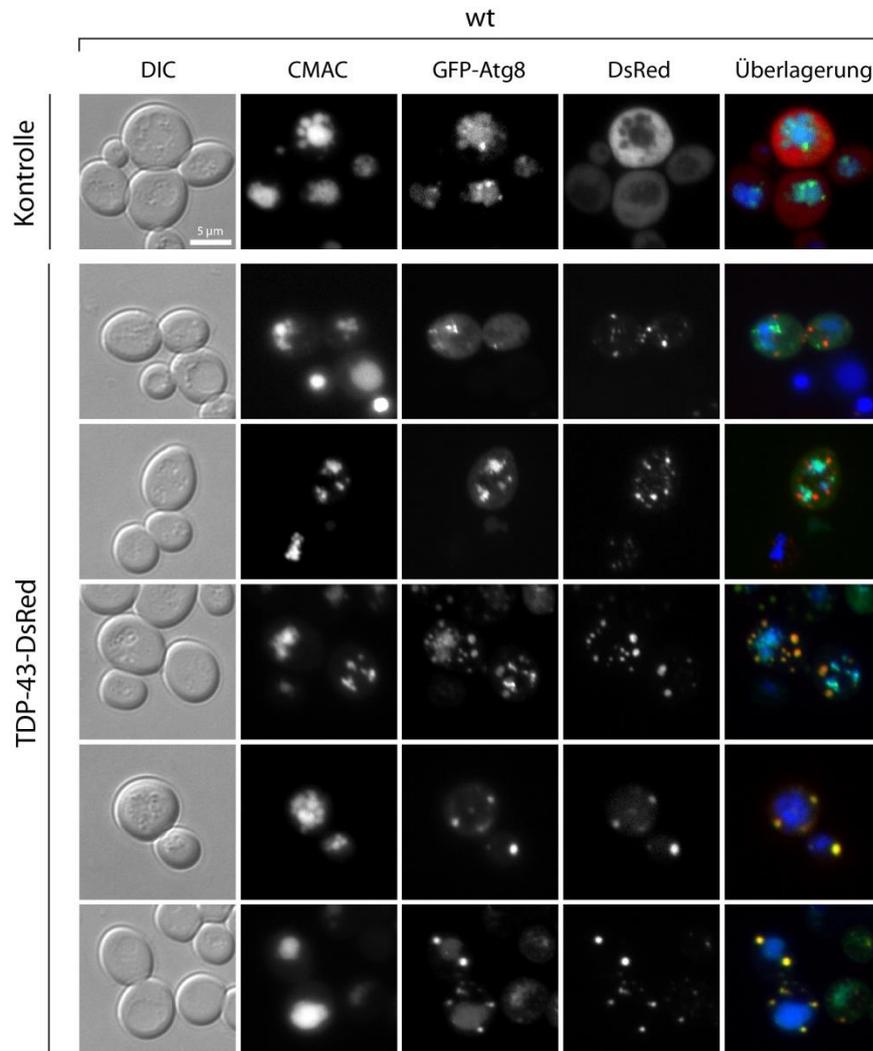
**Abb. 36: Kolokalisationsanalyse von TDP-43-GFP und RFP-Vam3.** Wildtyp- und  $\Delta vam3$ -Zellen, welche TDP-43-GFP und RFP-Vam3 exprimierten, wurden nach ca. 16 Stunden im Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) während der frühstationären Phase mikroskopiert. Eine Kolokalisation beider Fluoreszenzproteine konnte nicht beobachtet werden. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2 Die TDP-43-Eliminierung mittels Autophagie und UPS ist kontrovers

Die bisherigen Ergebnisse suggerieren eine untergeordnete Rolle der Autophagie beim TDP-43-Eliminierungsprozess. Zwar verändert die Expression von TDP-43 die Autophagie, indem es diese forciert und ungewöhnlich früh induziert, allerdings konnte durch die Hemmung des autophagischen Prozesses keine eindeutige Zytotoxizitätssteigerung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte die Deletion von UPS-Komponenten zu einer Zunahme der TDP-43-bedingten Toxizität. In den nächsten Versuchen sollten beide Transportwege genauer und im Zusammenhang betrachtet werden.

Im ersten experimentellen Ansatz wurde das GFP-markierte autophagische Protein Atg8 zusammen mit TDP-43-DsRed fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierfür wurde der Wildtyp mit einem GFP-Atg8-codierenden Plasmid und einem DsRed-fusionierten Kontroll- bzw. TDP-43-codierenden Konstrukt (pAG423) transformiert (siehe Abschnitt 3.7). Ausgewertet wurden frühstationäre Zellen nach ca. 16 Stunden im Expressionsmedium

(SCGal-Leu-His). Bei 31% (+/-3%) aller detektierbaren TDP-43-DsRed-Aggregate (Mittelwert aus drei verschiedenen Klonen aus zwei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler) konnte eine Kolokalisation mit GFP-Atg8 gefunden werden (Abb. 37).

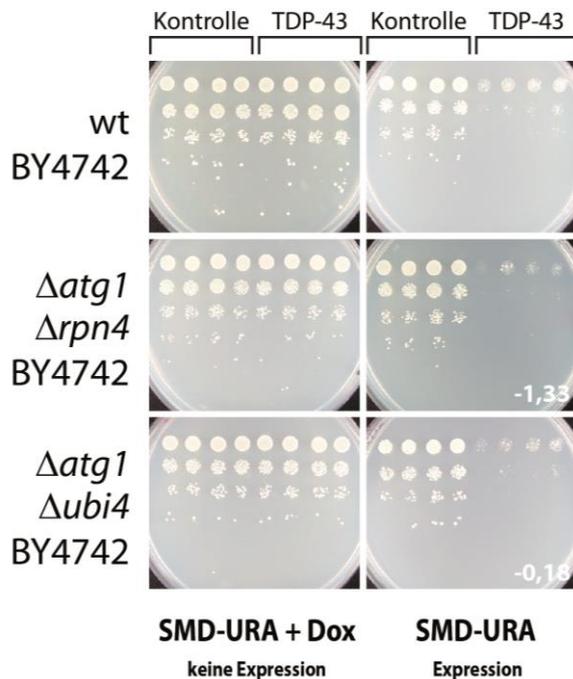


**Abb. 37: Lokalisation von GFP-Atg8 und TDP-43-DsRed.** Wildtypzellen wurden mit einem Galaktose-induzierbaren TDP-43-DsRed-codierenden Konstrukt und einem GFP-Atg8-codierenden Plasmid transformiert und während der frühstationären Phase, nach 16 Std. im Expressionsmedium (SCGal-Leu-His), mikroskopisch ausgewertet. Ungefähr 31% der TDP-43-DsRed-Aggregate kolokalisiert mit GFP-Atg8. Maßstab: 5 µm.

Dieses Ergebnis deutet auf, dass TDP-43-Aggregate ein Substrat der (Makro-)Autophagie darstellen und mit Hilfe von Atg8 für den autophagischen Prozess markiert werden. Jedoch hat die (Makro-)Autophagie keinen Einfluss auf die TDP-43-bedingte Zytotoxizität, wodurch vermutet werden kann, dass nur geringe Mengen an TDP-43 abgebaut oder vor allem nichttoxische TDP-43-Spezies (z. B. nichttoxische Großaggregate) durch die Autophagie eliminiert werden.

Als nächstes sollten die Auswirkungen der TDP-43-Expression auf Doppeldeletionsstämme für die Autophagie und des UPS analysiert werden. Dazu wurde der  $\Delta atg1$ -Stamm mit  $\Delta rpn4$  bzw.  $\Delta ubi4$  gepaart und die haploiden Zellen mit einem TDP-43-codierenden Plasmid (pCM190) transformiert (siehe Abschnitt 3.6 und 3.7). Mit Hilfe des Tüpfeltests sollte die

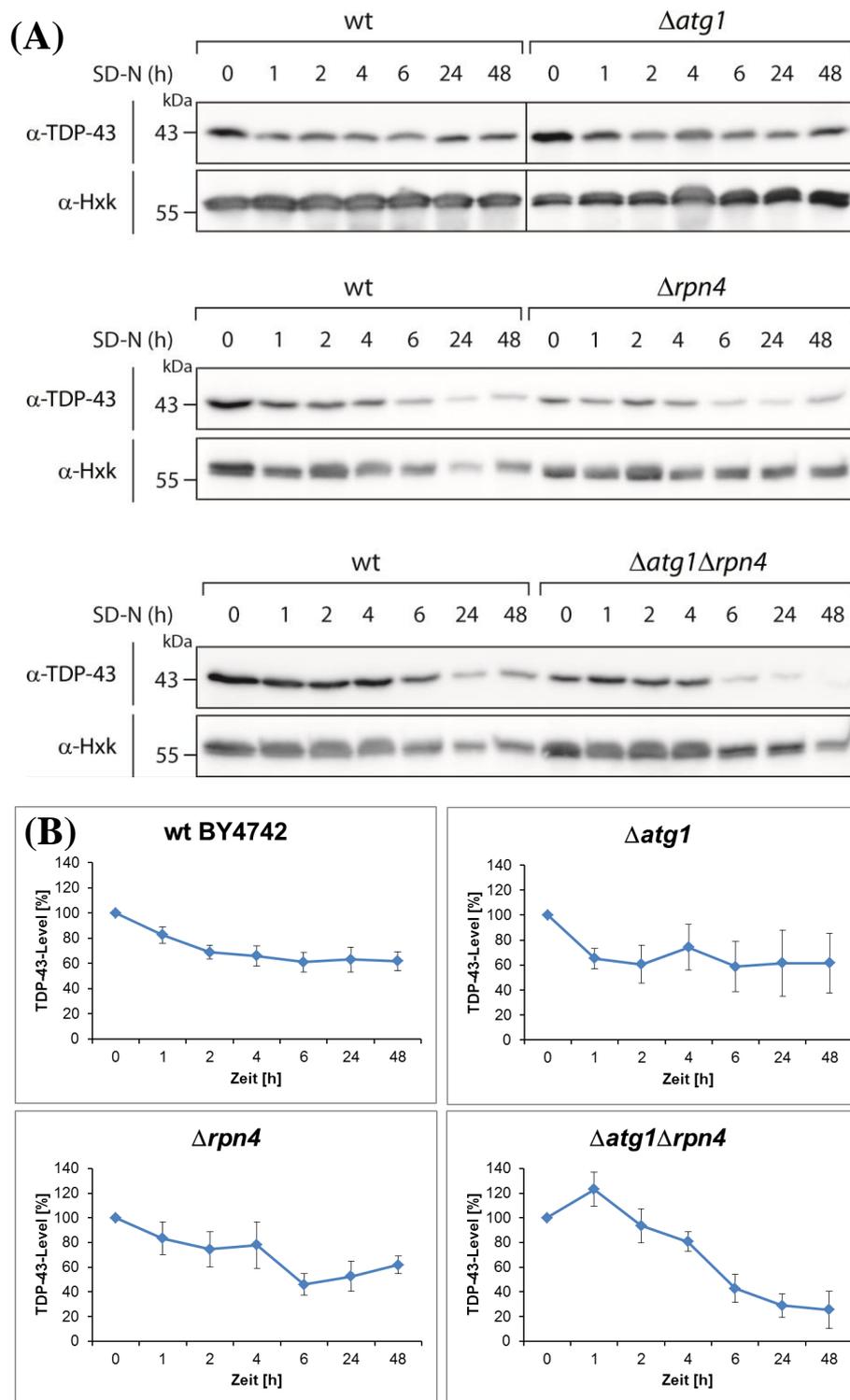
durch TDP-43-verursachte Zytotoxizität in den Doppeldeletionsstämmen bestimmt werden (Abb. 38).



**Abb. 38: Die Hemmung des autophagischen und proteasomalen Abbauwegs erhöht die TDP-43-bedingte Zytotoxizität.** Der Wildtyp und die Doppeldeletionsstämmen wurden mit einem Doxycyclin-abhängigen Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert, auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) getüpfelt und für drei Tage inkubiert. Die Expression von TDP-43 verursachte eine Reduktion des Zellwachstums sowohl im wt als auch in den Deletionsstämmen. Im Vergleich zum wt war das Wachstumsdefizit in den Doppeldeletionsstämmen verstärkt.  $\Delta atg1 \Delta rpn4$  besaß einen Wachstumsindex von -1,33 und  $\Delta atg1 \Delta ubi4$  von -0,18. Die deletierten Stämme zeigten somit ein ähnliches Wuchsverhalten wie die UPS-Einfachdeletionsstämmen (siehe Abschnitt 4.1.3.:  $\Delta rpn4$ : -0,73;  $\Delta ubi4$ : -0,21).

Im Wildtyp konnte eine Wachstumsreduktion bedingt durch die Expression von TDP-43 beobachtet werden. Diese war in den Doppeldeletionsstämmen gegenüber der wildtypischen Kontrolle verstärkt. Jedoch wiesen  $\Delta atg1 \Delta rpn4$  und  $\Delta atg1 \Delta ubi4$  keine additiven Effekte zu ihren Einzeldelionsstämmen auf (siehe Abb. 11 und 12). Daher bleibt die Vermutung bestehen, dass weder das UPS noch die Autophagie vorrangig für die Minderung der TDP-43-Toxizität benötigt werden.

Um zu überprüfen, ob TDP-43 ein Substrat der Autophagie oder des UPS ist, wurden die TDP-43-Level beim wt, bei den Deletionsstämmen  $\Delta atg1$  bzw.  $\Delta rpn4$  und beim Doppeldeletionsstamm  $\Delta atg1 \Delta rpn4$  untersucht. Die Kulturen wurden bei nährstoffarmen Bedingungen (SD-N) bei reprimierter TDP-43-Expression über 48 Stunden kultiviert und mittels Western Blot ausgewertet (siehe Abschnitt 3.5.5, 3.11 und 3.12). Bei allen analysierten Stämmen konnte eine kontinuierliche Abnahme des TDP-43-Levels über die Zeit beobachtet werden (Abb. 39). Bemerkenswert war hierbei, dass beim Wildtyp und bei allen Einzeldelionsstämmen eine Reduktion des TDP-43-Levels um ca. 40% beobachtet werden konnte. Ferner zeigte der  $\Delta rpn4$ -Stamm nach sechs Stunden im Hungermedium eine leichte Zunahme des Niveaus um ca. 10%. Nur  $\Delta atg1 \Delta rpn4$  wies zu Beginn der Kultivierung einen



**Abb. 39: Abbau von TDP-43 bei reprimierter Expression während des Hungerns in Stämmen mit beeinträchtigter Autophagie und/oder UPS.** (A) Der Wildtyp und die Deletionsstämme  $\Delta atg1$ ,  $\Delta rpn4$  und  $\Delta atg1\Delta rpn4$  wurden mit einem Doxycyclin-regulierbaren TDP-43-codierenden Plasmid transformiert und während nährstoffreichen (SMDGalRD, t=0) Expressionsbedingungen bzw. nährstoffarmen (SD-N+Dox) Nicht-Expressionsbedingungen auf das zelluläre TDP-43-Level analysiert. Die Hexokinase diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung des TDP-43-Niveaus aus (A). Über die Zeit war bei allen analysierten Stämmen eine kontinuierliche Abnahme des TDP-43-Niveaus zu beobachten. Das Level berechnete sich aus dem Mittelwert von 16 (wt), zwei ( $\Delta atg1$ ), vier ( $\Delta rpn4$ ) bzw. fünf ( $\Delta atg1\Delta rpn4$ ) biologischer Proben zweier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken: Standardfehler.

leichten TDP-43-Anstieg um 20% auf. Nach zwei Stunden sank das Niveau fortwährend auf den niedrigsten Stand von allen untersuchten Stämmen. Zum Messzeitpunkt 48 Stunden lag der Wert für TDP-43 bei  $\Delta atg1\Delta rpn4$  bei nur noch 26%. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass weder die Autophagie noch das UPS vorrangig für den Abbau von TDP-43 benötigt werden. Bei der Doppelmutante ist anfänglich eine leichte Anreicherung von TDP-43 zu beobachten. Allerdings sank das Niveau für das neurotoxische Protein anschließend drastisch. Vielleicht werden beide Wege zu Beginn des Eliminierungsprozesses benötigt. Jedoch erfolgt die spätere Reduktion des TDP-43-Levels höchstwahrscheinlich über einen anderen Abbauprozess, wie z. B. die Endozytose und den MVB-Weg.

Zusammengenommen sind die Resultate bezüglich der Eliminierung von TDP-43 über die Autophagie und das UPS widersprüchlich. Einerseits kolokalisiert Atg8 mit TDP-43, was für eine Markierung des toxischen Proteins für die Autophagie spricht. Andererseits erfolgt eine stetige Abnahme des TDP-43-Levels trotz Hemmung des autophagischen oder proteasomalen Wegs. Speziell für das UPS kann die im Tüpfeltest beobachtete erhöhte Zytotoxizität nicht auf ein gesteigertes TDP-43-Niveau zurückgeführt werden. Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass ein dritter proteolytischer Prozess, wie etwa der MVB-Weg, primär für den TDP-43-Abbau verantwortlich ist und nicht die Autophagie oder das UPS.

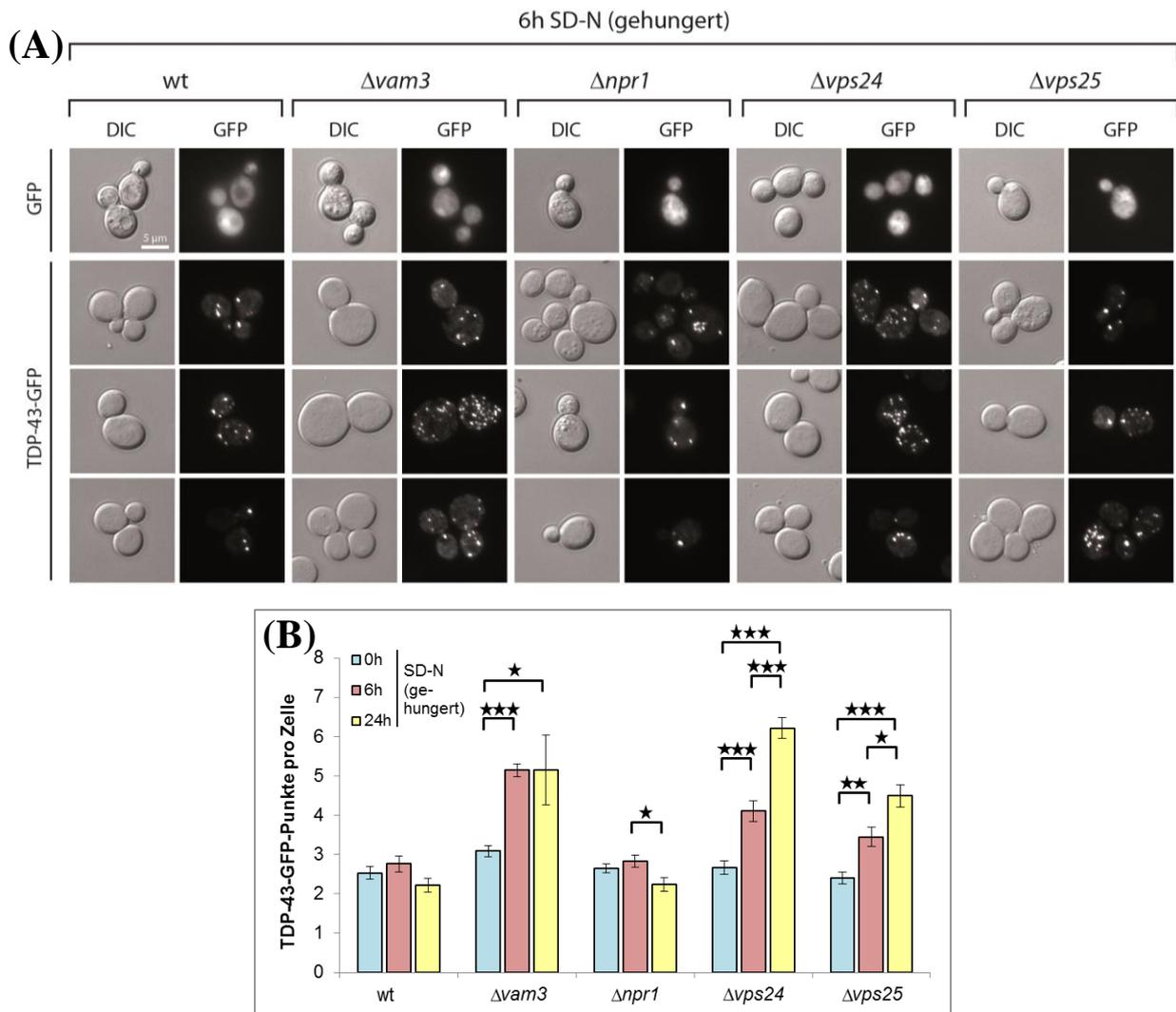
#### 4.3.3 Ein gestörter MVB-Weg forciert die TDP-43-Akkumulation

Alle vorausgegangenen Experimente wiesen darauf hin, dass der endosomal-vakuoläre Transportweg und die Vakuolenfusion am Entfernen von TDP-43 aus der Zelle beteiligt sind. Um zu überprüfen, ob neben der vakuolären Fusion auch die Endozytose und der MVB-Weg am Abbau von TDP-43 mitwirken, wurden mehrere Deletionsstämme mikroskopisch und biochemisch analysiert. Abgesehen vom wt und vom  $\Delta vam3$ -Stamm, wo bereits eine TDP-43-Akkumulation nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Auswertung von  $\Delta npr1$ ,  $\Delta vps24$  und  $\Delta vps25$ . Npr1 ist ein negativer Regulator der Endozytose. Wird das Gen deletiert bedingt dies eine Endozytoseinduktion und führt zu einer Minderung der TDP-43-verursachten Toxizität (MacGurn *et al.* 2011; siehe Abschnitt 4.1.4). Werden allerdings  $\Delta vps24$  oder  $\Delta vps25$  (ESCRT-II bzw. III) mutiert führt dies zu einer Störung des MVB-Wegs und zu einer Steigerung der TDP-43-Zytotoxizität (Rothman *et al.* 1989, Babst *et al.* 2002A, 2002B; siehe Abschnitt 4.1.4). Für die Bestimmung der TDP-43-Aggregate in den Deletionsstämmen erfolgte deren Transformation mit einem Kontroll-GFP- oder TDP-43-GFP-codierenden Plasmid (pUG35) (siehe Abschnitt 3.7). Die Kulturen wurden zunächst in nährstoffreichem Expressionsmedium (SMD+Lys+Leu+His) angezogen und nach ca. 16 Stunden geerntet

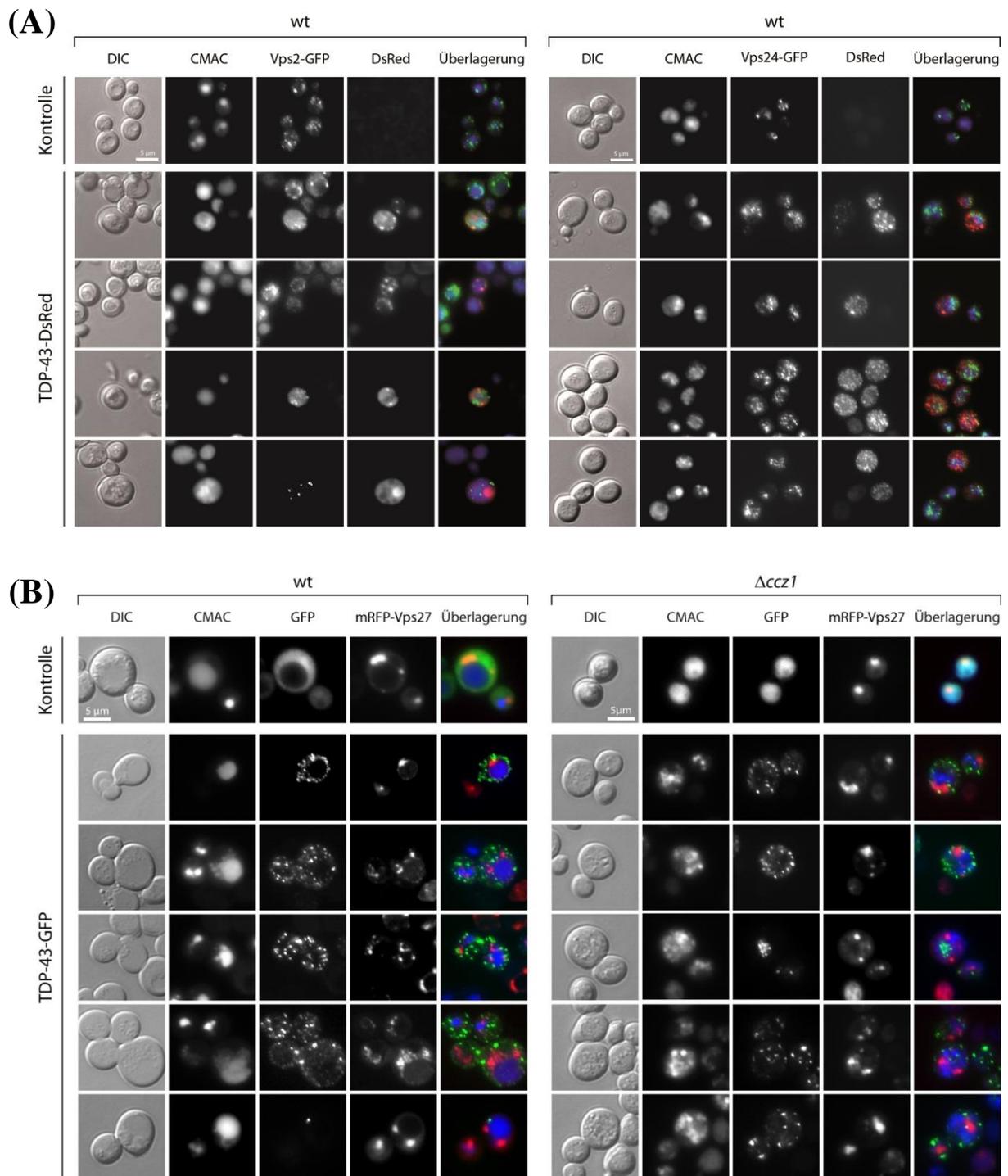
(t=0). Die übrige Zellkultur wurde in stickstoffarmes Medium (SD-N) bei fortlaufender TDP-43-Expression überführt und für sechs bzw. 24 Stunden gehungert (siehe Abschnitt 3.5.5). Es konnte erneut eine TDP-43-GFP-Aggregatanreicherung in  $\Delta vam3$  nach sechs und 24 Stunden Hungern gezeigt werden (Abb. 40 und Anhang Abb. XII). Auch in beiden MVB-Deletionsstämmen wurde eine signifikante TDP-43-GFP-Akkumulation während des Hungerns nachgewiesen. Lagen die TDP-43-GFP-Punkte beider Stämme nach sechs Stunden noch unterhalb von  $\Delta vam3$ , so besaß  $\Delta vps24$  mit 6,2 Aggregaten pro Zelle die meisten Punkte nach 24 Stunden. Etwas schwächer in der Ausprägung war die Anreicherung von TDP-43-GFP in  $\Delta vps25$ . Jedoch konnte auch hier eine stetig markante Zunahme beobachtet werden. Des Weiteren war auffällig, dass im  $\Delta npr1$ -Stamm keine dramatische Reduktion der TDP-43-GFP-Menge belegbar war. Trotz der signifikanten Abnahme der TDP-43-GFP-Punkte zwischen sechs und 24 Stunden, verhielt sich der Deletionsstamm im Allgemeinen wie der Wildtyp. Im Großen und Ganzen kann nicht restlos ausgeschlossen werden, dass die Endozytose bei der Beseitigung von TDP-43 involviert ist. Allerdings gilt es als wahrscheinlich, dass der MVB-Weg benötigt wird, um TDP-43 abzubauen.

Um diese These zu untermauern, wurden verschiedene MVB-Komponenten und das MVB-Substrat Sna3-GFP näher auf eine mögliche Interaktion mit TDP-43 überprüft. Als Bestandteil des MVB-Wegs dienten hierbei Vps27 (ESCRT-0), Vps2 und Vps24 (ESCRT-III). Die ESCRT-III-Komponenten waren genomisch mit GFP markiert und enthielten entweder das Kontrollplasmid pAG416GAL-ccdb-DsRed oder das TDP-43-codierende Konstrukt pAG416GAL-TDP-43-DsRed (siehe Abschnitt 3.1 und 3.7). Die Probengenerierung und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit Vps2 bzw. Vps24 erfolgten unter Anleitung durch Robin Weinmann (Bachelorarbeit WS 2015/2016). Das mRFP-Vps27 Plasmid wurde zusammen mit einem Kontroll-GFP- bzw. TDP-43-GFP-codierenden Konstrukt (pUG35) in den Wildtyp und in die Deletionsmutante  $\Delta ccz1$  transformiert (siehe Abschnitt 3.7). Das Plasmid für das Fusionsprotein Sna3-GFP wurde mit einem pAG423-Kontroll- oder TDP-43-DsRed Vektor in den Wildtyp und in  $\Delta vam3$  eingebracht. Die Zellkultivierung bei den ESCRT-Komponenten und beim Sna3-GFP-Assay erfolgte in SMD+Lys+His bzw. in SMD+Leu+Lys Expressionsmedium. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit CMAC gefärbt und mikroskopisch analysiert (siehe Abschnitt 3.5.4 und 3.10). Bei keinem der MVB-Komponenten konnte eine Kollokalisierung mit TDP-43 beobachtet werden (Abb. 41). Dies traf sowohl für den Wildtyp, als auch für  $\Delta ccz1$  zu. Allerdings kolokalisierten im Wildtyp 17% (+/-3%) und in  $\Delta vam3$  4% (+/-0,5%) der TDP-43-Aggregate mit Sna3-GFP (Mittelwert aus zwei Klonen eines Experiments mit Standardfehler)

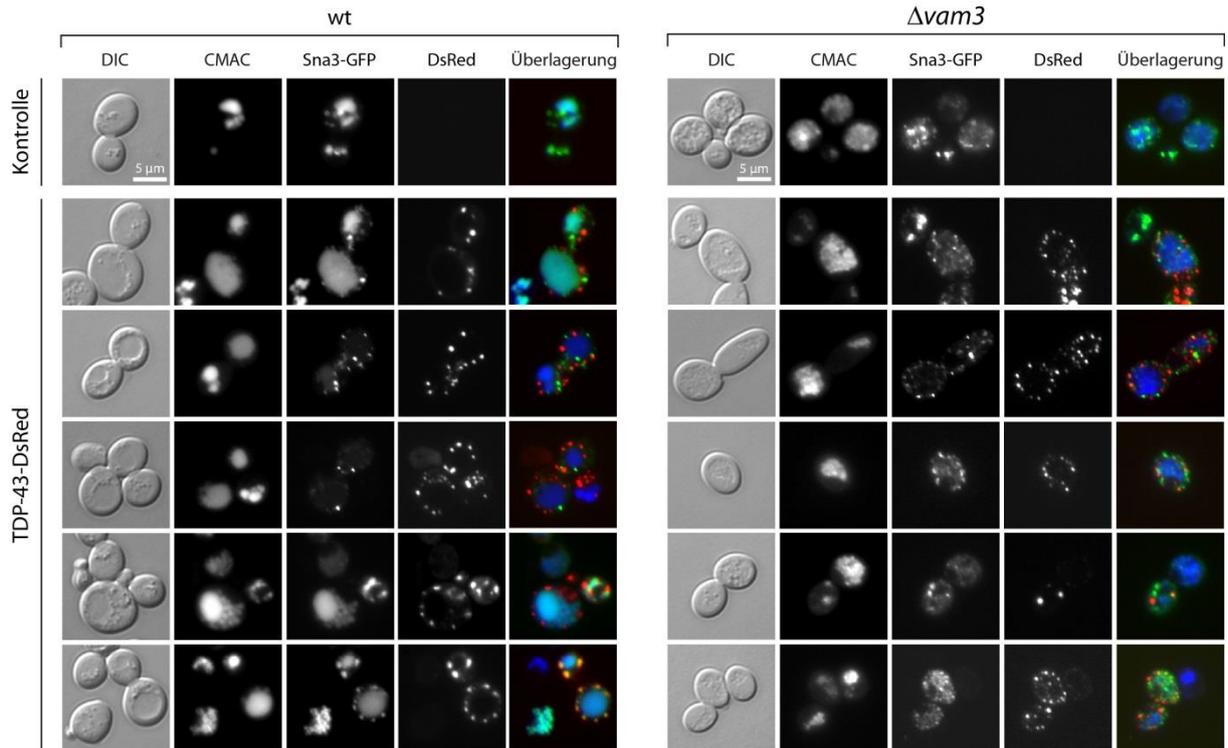
(Abb. 42). Diese Daten untermauern die Aussage, dass der MVB-Weg am Abbau von TDP-43 involviert ist.



**Abb. 40: Die Hemmung des MVB-Wegs steigert die Anzahl der TDP-43-GFP-Aggregate.** (A) Die Stämme (wt,  $\Delta vam3$ ,  $\Delta npr1$ ,  $\Delta vps24$ ,  $\Delta vps25$ ), welche TDP-43-GFP exprimierten, wurden während nährstoffreichen (SMD-Ura) und nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen kultiviert und geerntet. Als Beispiel wurde die Anzahl der TDP-43-GFP-Punkte nach sechs Stunden Hungern ausgewählt. Die Bildtafeln für 0 und 24 Std. sind im Anhang Abb. XII zu finden. (B) Quantifizierung der TDP-43-GFP-Punkte pro Zelle wie in (A) beschrieben. Über die Zeit konnte eine signifikante Zunahme der TDP-43-GFP-Punkte in den Stämmen mit einer gestörten Vakuolenfusion und einem gehemmten MVB-Weg beobachtet werden. Gezeigt wird der Mittelwert aus sechs biologischen Proben von zwei unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .



**Abb. 41: Kolokalisationsanalyse von Vps2-GFP, Vps24-GFP, mRFP-Vps27 mit TDP-43-DsRed bzw. TDP-43-GFP.** (A) Wildtypische Zellen mit einem genomisch markiertem Vps2 bzw. Vps24 wurden mit einem TDP-43-DsRed-codierenden Konstrukt transformiert und während der frühstationären Phase von Robin Weinmann (Bachelorarbeit WS 2015/2016) mikroskopiert. (B) Die wt und  $\Delta ccz1$  Zellen enthielten ein mRFP-Vps27 und TDP-43-GFP Konstrukt und wurden nach ca. 16 Stunden im Expressionsmedium (SMD-Ura-Leu) analysiert. Sowohl bei (A) als auch bei (B) konnte keine Kolokalisation der Fluoreszenzproteine beobachtet werden. Die Vakuole wurde mittels CMAC gefärbt. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .



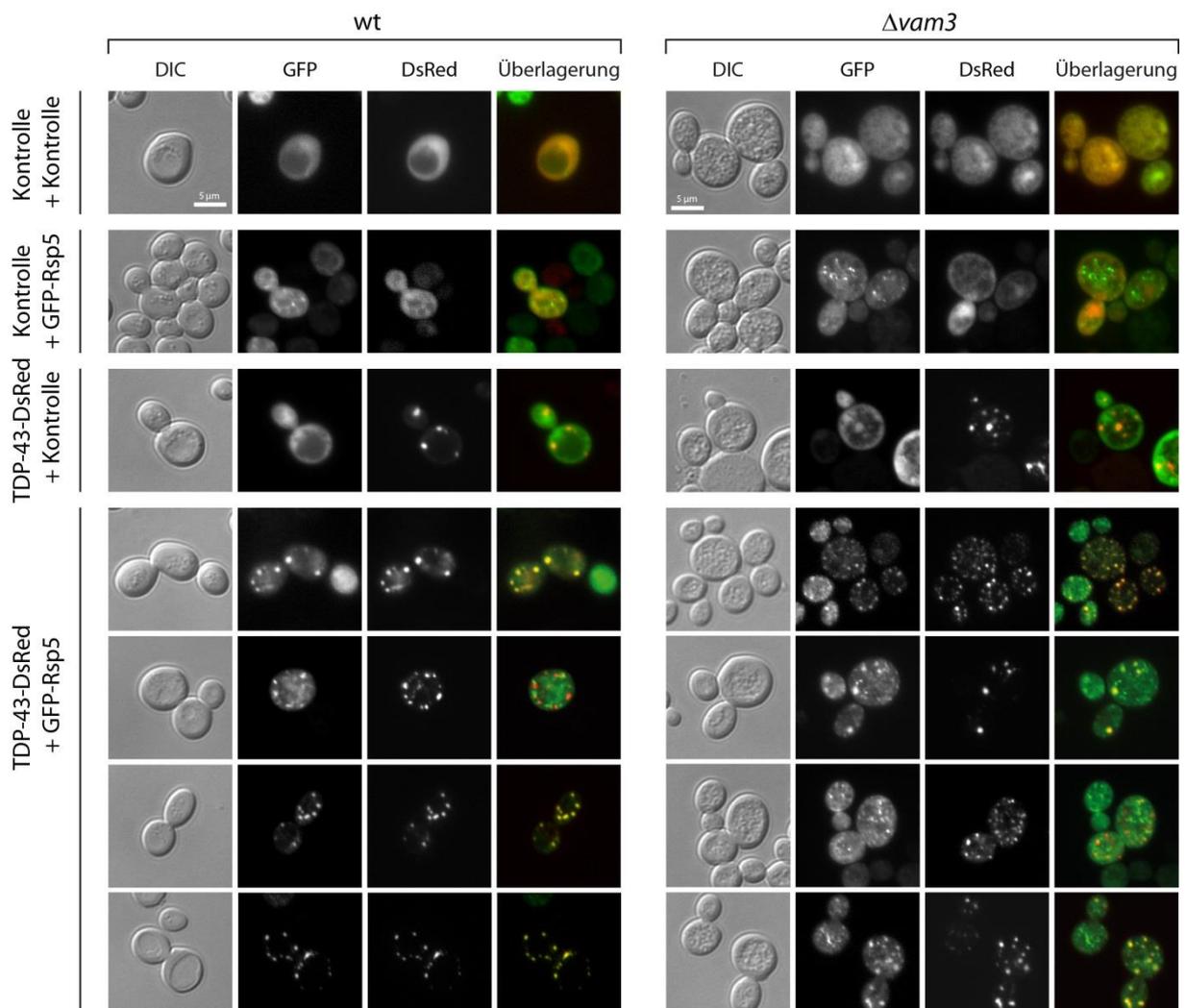
**Abb. 42: Lokalisation des MVB-Substrats Snai3-GFP und TDP-43-DsRed.** Wildtypische und  $\Delta vam3$  Zellen wurden mit Snai3-GFP- und TDP-43-DsRed-codierenden Konstrukten transformiert und während der frühstationären Phase, nach 16 Stunden im Expressionsmedium (SMD-Ura-His), ausgewertet. Im wt kolokalisierten ca. 17% und im  $\Delta vam3$ -Stamm ca. 4% der TDP-43-DsRed-Aggregate mit Snai3-GFP-Punkten. Die Vakuole wurde mittels CMAC gefärbt. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.4 Die Ubiquitinligase Rsp5 ist eine Schlüsselkomponente für den Abbau von TDP-43

Die Hemmung des MVB-Wegs resultierte in einer gesteigerten TDP-43-bedingten Zytotoxizität und in einer Anreicherung von TDP-43. Um zu klären, wie das neurotoxische Protein in den MVB-Weg eingreift bzw. über diesen Weg abgebaut wird, wurde das multifunktionale Protein Rsp5 analysiert. Rsp5 ist eine Ubiquitinligase (E3), welche zahlreiche zelluläre Prozesse reguliert (Belgareh-Touzé *et al.* 2008). So ist es an der Ubiquitinierung mehrerer Plasmaproteine und deren Aufnahme durch die Endozytose beteiligt. Ferner fördert die Anlagerung von Ubiquitin die Sortierung der abzubauenen Proteine im MVB-Weg. Rsp5 ist am Proteintransport vom Golgi-Apparat zum MVB, bei der Beseitigung hitzeschockgeschädigter Proteine über das UPS und an der Ubiquitin-abhängigen Autophagie beteiligt (Jarmoszewicz *et al.* 2012, Fang *et al.* 2014, Lu *et al.* 2014).

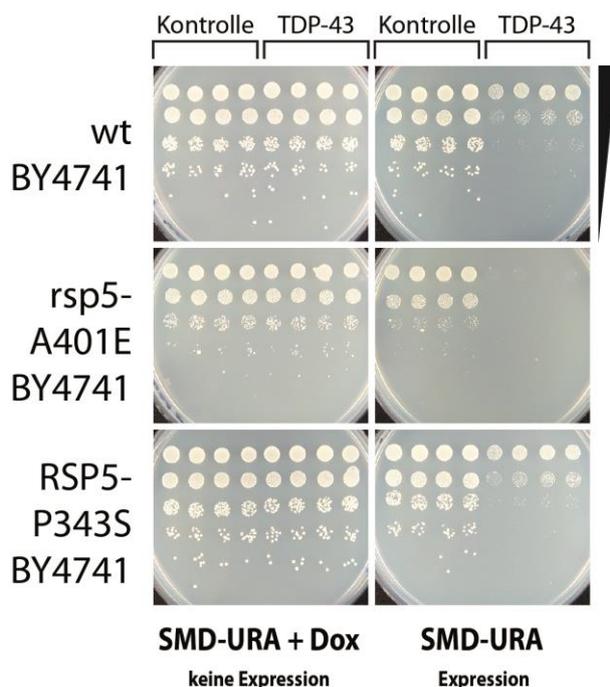
In ALS-Patienten und mehreren Modellorganismen wurden ubiquitinierte TDP-43-Aggregate entdeckt (Neumann *et al.* 2006, Igaz *et al.* 2009, Wegorzewska *et al.* 2009). Im folgenden Experiment sollte die Lokalisation von TDP-43 und Rsp5 untersucht werden. Hierfür erfolgte

die Transformation wildtypischer und  $\Delta vam3$ -Zellen mit einem GFP-Kontroll- oder GFP-RSP5-codierenden Plasmid und einem Kontroll-Ds-Red bzw. TDP-43-Ds-Red-codierenden Konstrukt (pAG423) (siehe Abschnitt 3.7). Die Kulturen wurden über Nacht in SMGal+Leu+Lys Expressionsmedium inkubiert und mikroskopiert (siehe Abschnitt 3.5.6 und 3.10). Sowohl im wt, als auch im Deletionsstamm konnte eine starke Überlagerung beider Proteine festgestellt werden (Abb. 43). Die Kolokalisationsrate der TDP-43-Aggregate lag im Wildtyp bei 42% (+/-4%) (Mittelwert aus vier Klonen zweier unabhängiger Experimente mit Standardfehler). Der Prozentsatz im  $\Delta vam3$ -Stamm konnte auf Grund der unübersichtlichen Menge an TDP-43-Punkten nicht ermittelt werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass TDP-43 von Rsp5 für den Abbau über den MVB-Weg markiert wird.



**Abb. 43: Lokalisation von GFP-Rsp5 und TDP-43-DsRed.** Wildtyp- und  $\Delta vam3$ -Zellen, welche GFP-Rsp5 und TDP-43-DsRed bzw. deren Kontrollen enthielten, wurden über Nacht in Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) kultiviert und während der frühstationären Phase untersucht. Beide Proteine zeigten eine starke Kolokalisation sowohl im wt (42%) als auch im Deletionsstamm.

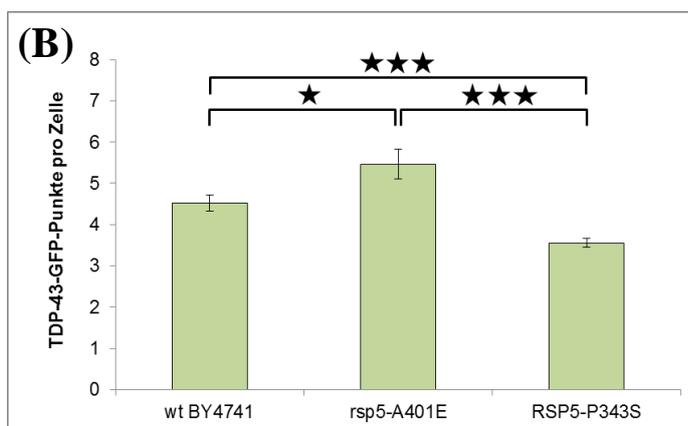
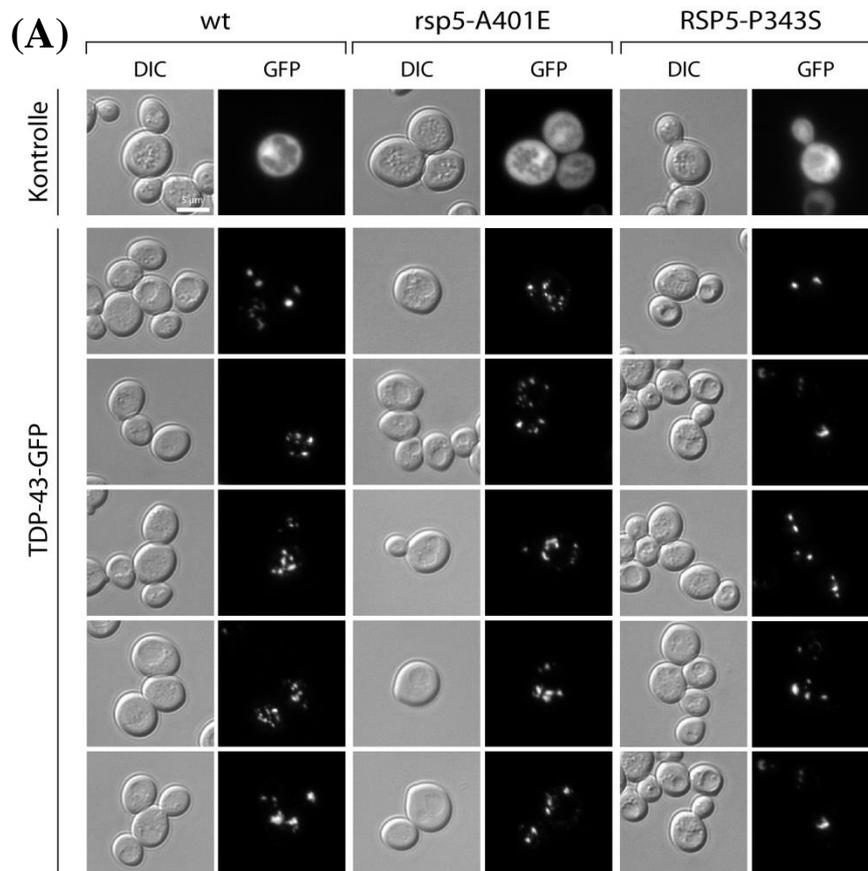
In einem umgekehrten Fall könnte eine Steigerung bzw. eine Reduktion der Rsp5-Funktion das Level von TDP-43 in der Zelle verändern. Diese Hypothese sollte mit den Rsp5-Varianten *rsp5-A401E* und *RSP5-P343S* bestätigt werden. Der erste Aminosäureaustausch führt zu einer herabgesetzten Rsp5-Aktivität (*loss-of-function*), wohingegen *P343S* die Ubiquitinierung von Proteinen steigert (Wijayanti *et al.* 2015). Als erstes wurden die Veränderungen im Wachstum mittels Tüpfeltest analysiert. Hierzu erfolgte die Transformation des Wildtyps und der beiden Varianten für Rsp5 mit einem Kontroll- oder einem TDP-43-codierenden Konstrukt (pCM190) (siehe Abschnitt 3.7). Es zeigte sich, dass im *rsp5-A401E*-Stamm die TDP-43-verursachte Toxizität stark erhöht war (Abb. 44). Andererseits besaß *RSP5-P343S* einen ähnlichen Wuchs, wie der Kontrollstamm. Somit kann vermutet werden, dass ein Herabsetzen der Rsp5-Aktivität die TDP-43-Toxizität verstärkt, weil der Abbau des Proteins beeinträchtigt ist.



**Abb. 44: TDP-43-bedingte Zytotoxizität im Wildtyp und in Stämmen mit Rsp5-Varianten verschiedener Aktivität.** Die drei Stämme wurden mit einem Doxycyclin-regulierbaren TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert, auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura-/±Dox) getüpfelt und für drei Tage inkubiert. Die Expression von TDP-43 verursachte eine Reduktion des Wachstums sowohl im wt als auch in den Stämmen, die die beiden Rsp5-Varianten exprimierten. Die Zytotoxizität war beim wt und *RSP5-P343S* (mit erhöhter Ubiquitinierungsaktivität) ähnlich stark ausgeprägt. Jedoch konnte bei *rsp5-A401E* (mit niedrigerer Rsp5-Aktivität) eine stark erhöhte Toxizität bei der Expression von TDP-43 beobachtet werden.

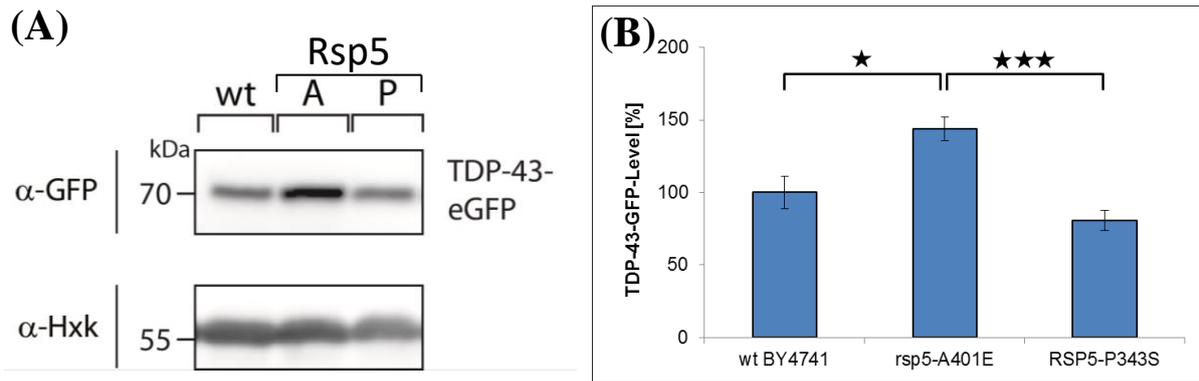
Daher sollte überprüft werden, ob die gesteigerte TDP-43-Toxizität auf ein erhöhtes TDP-43-Level zurückzuführen ist. Hierfür wurden der Wildtyp und beide Rsp5-Varianten mit einem Kontroll-GFP- oder TDP-43-GFP-codierenden Konstrukt (pAG423) transformiert (siehe Abschnitt 3.7). Die Zellen wurden für ca. 16 Stunden in Expressionsmedium (SCGal-His) kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot Analyse untersucht (siehe Abschnitt 3.10, 3.11 und 3.12). Bei beiden Untersuchungsmethoden konnte für die *rsp5-A401E*-Variante eine Anreicherung von TDP-43-GFP-Aggregaten bzw. eine signifikante Steigerung des TDP-43-GFP-Niveaus gegenüber dem wt festgestellt werden (Abb. 45 und

46). Bei RSP5-P343S waren die TDP-43-GFP-Punkte signifikant im Vergleich zur Kontrolle und zur *rsp5-A401E*-Variante reduziert. Auch beim Western Blot war das Level für TDP-43-GFP gegenüber dem *rsp5-A401E*-Stamm markant erniedrigt. Zusammengenommen sprechen all diese Resultate für eine direkte Beteiligung der Ubiquitinligase Rsp5 am TDP-43-Eliminierungsprozess.



**Abb. 45: Die Rsp5-Aktivität determiniert die Anzahl der zellulären TDP-43-GFP-Aggregate.** (A) Der Wildtyp und die RSP5-Varianten A401E und P343S wurden mit einem Galaktose-regulierbaren Kontroll- oder TDP-43-GFP-codierenden Konstrukt transformiert, in Expressionsmedium (SCGal-His) ca. 16 Stunden kultiviert und mikroskopiert. (B) Quantifizierung der TDP-43-GFP-Punkte pro Zelle wie in (A) beschrieben. Die Abnahme der Rsp5-Aktivität im A401E-Stamm führte

zu einem signifikanten Anstieg der TDP-43-GFP-Aggregate. Andererseits verursachte die gesteigerte Funktion von Rsp5 im P343S-Stamm eine markante Reduktion der TDP-43-GFP-Punkte pro Zelle. Dargestellt wurde der Mittelwert aus acht biologischen Proben von zwei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test:  $p$ -Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

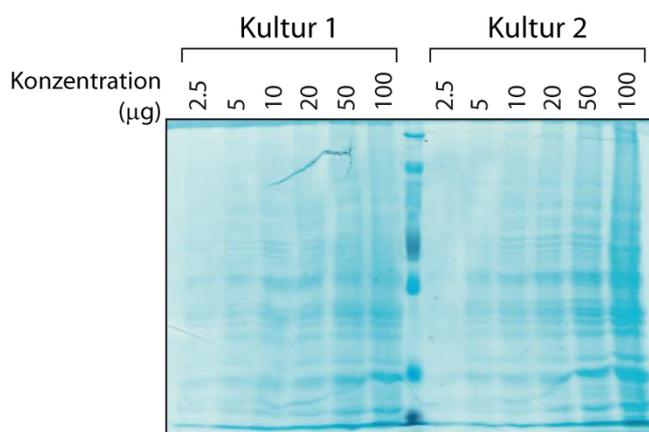


**Abb. 46: Die Rsp5-Aktivität bestimmt das TDP-43-GFP-Level.** (A) Hefestämme, die wildtypisches Rsp5 oder die Rsp5-Varianten A401E und P343S exprimierten, wurden mit einem Galaktose-regulierbaren Kontroll- oder TDP-43-GFP-codierenden Konstrukt transformiert, in Expressionsmedium (SCGal-His) für ca. 16 Stunden kultiviert, geerntet, aufgeschlossen und mittels Western Blot biochemisch analysiert. A: *rsp5-A401E*; P: *RSP5-P343S* (B) Quantifizierung des TDP-43-GFP-Niveaus wie aus (A) erläutert. Der partielle Funktionsverlust von Rsp5 im A401E-Stamm bedingte eine Zunahme des TDP-43-GFP-Levels. Die P343S-Variante, mit seiner verbesserten Ubiquitinierungsaktivität, führte zu einer Abnahme des TDP-43-GFP-Niveaus. Bestimmt wurde der Mittelwert aus vier biologischen Proben aus einem experimentellen Versuch. Fehlerbalken: Standardfehler; Student's t-test: p-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.4 Quantitative Veränderung der zellulären Proteinzusammensetzung bei TDP-43-Expression

Die Expression von TDP-43 ist in der Hefe nachweislich zytotoxisch (Johnson *et al.* 2008) und wirkt sich u. a. auf die Vakuolenmorphologie und die vakuolären Proteinabbauwege aus (siehe Abschnitt 4.2). Mit Hilfe einer quantitativen Proteomanalyse sollten Proteine identifiziert werden, die bei der TDP-43-Expression veränderte zelluläre Proteinmengen aufwiesen. Zu diesem Zweck eignet sich die massenspektrometrische nichtradioaktive SILAC- (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) Analyse (de Godoy *et al.* 2006 und 2008, Schütz *et al.* 2010). Bei dieser Methode werden Aminosäuren eingesetzt, die stabile, nichtradioaktive Isotope (Atomkerne besitzen die übliche Anzahl an Protonen, aber mehr Neutronen) enthalten. Diese sogenannten schweren (oder *heavy*) Aminosäuren weisen eine exakt definierte Anzahl an isotopisch markierten Kohlenstoff- ( $^{13}\text{C}$ ), Wasserstoff- ( $^2\text{H}$ ) und/oder Stickstoffatomen ( $^{15}\text{N}$ ) auf. In dieser Arbeit wurden die schweren Aminosäuren Lys8 und Arg10 verwendet. Sie enthielten  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Atome. Da Arginin sechs  $^{13}\text{C}$ - bzw. vier  $^{15}\text{N}$ -markierte Atome beinhaltet ist diese insgesamt 10 Da schwerer als die unmarkierte (auch leichte oder *light*) Aminosäure. Die Isotopen-gekennzeichneten Aminosäuren, welche Hefekulturmedien beigemischt waren, wurden in die Hefezelle aufgenommen und in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Verglichen wurden zwei SILAC-Kulturen, die entweder das Kontrollplasmid oder das TDP-43-codierende Konstrukt

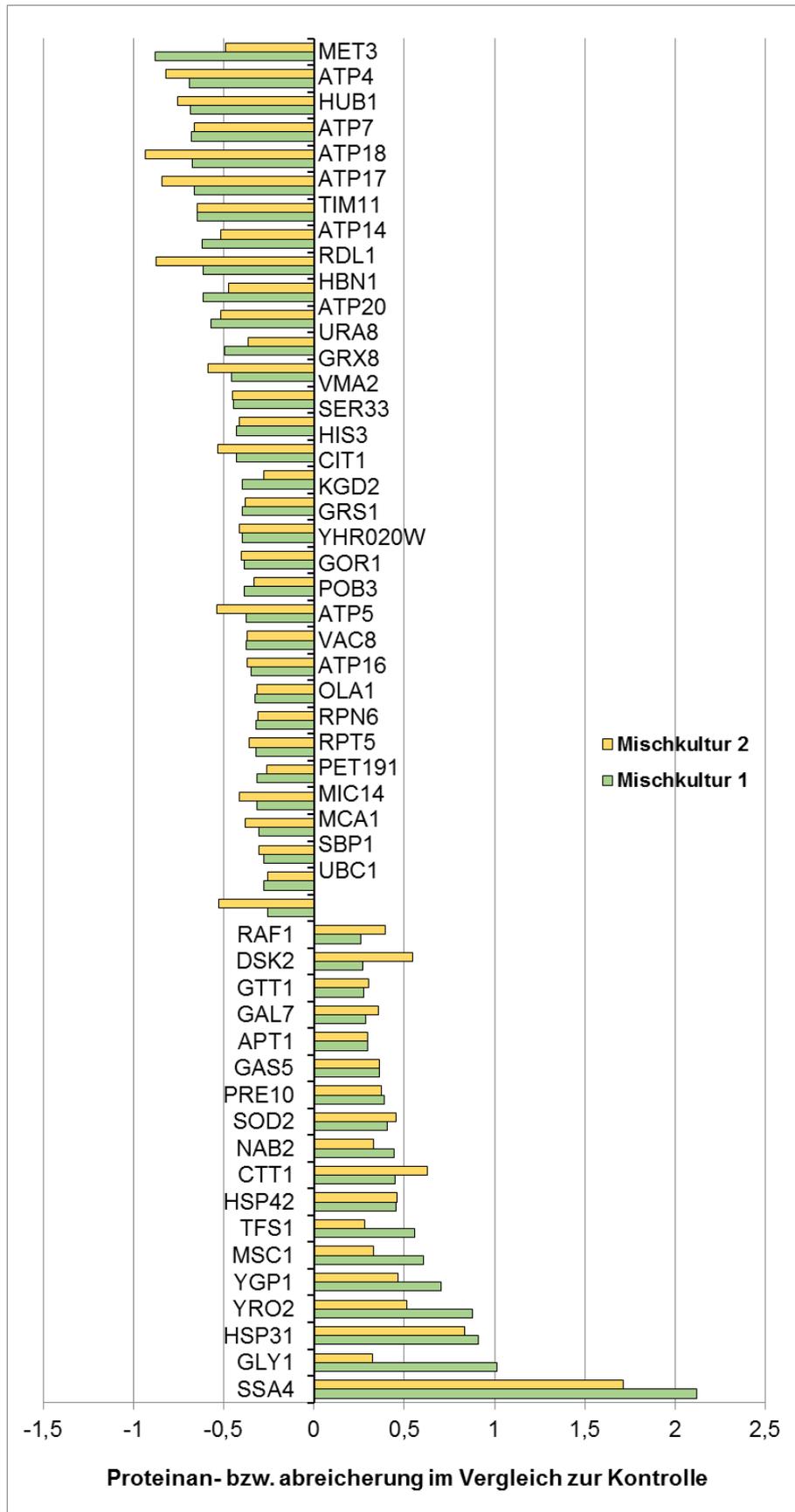
enthielten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über mehrere Tage im selben Medium. Damit sollte eine hohe Integrationsrate der markierten Aminosäuren in die Proteine sichergestellt werden (siehe Abschnitt 3.13). Nach der Inkubation im Expressionsmedium wurden die zu vergleichenden Kulturen (Kontrolle versus TDP-43-exprimierende Zellen) zu gleichen Teilen vermengt (Mischkultur 1 oder 2) und mit Hilfe einer CryoMill aufgeschlossen (siehe Abschnitt 3.13). Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte in Bayreuth mittels Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit. Zusätzlich wurde ein SDS-Gel mit Hilfe von Coomassie gefärbt, um eine Proteolyse auszuschließen (siehe Abschnitt 3.13 und Abb. 47). Die in RIPA gelösten Proteine wurden anschließend zur Analyse nach Freiburg in die *Core Facility Proteomics* versendet. Hier wurden die Proteine mit Proteasen verdaut und die Peptide massenspektrometrischen analysiert. Für jedes Peptid ergab sich ein spezifisches Signalpaar, das sich auf Grund der isotopisch markierten Aminosäuren in ihrer Masse unterschied. Die unterschiedliche Signalstärke innerhalb des Paares gibt hierbei die veränderte Proteinexpression wieder (Proteine sind an- bzw. abgereichert) (Schütz *et al.* 2010).



**Abb. 47: Ausschluss einer Proteolyse mittels Coomassie-Färbung.** Die mit Hilfe der CryoMill aufgeschlossenen und in RIPA-Puffer gelösten Zellkulturen wurden mit SDS-Probenpuffer verdünnt und in einer Konzentrationsreihe auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Eine Proteindenaturierung lag in beiden Kulturen nicht vor.

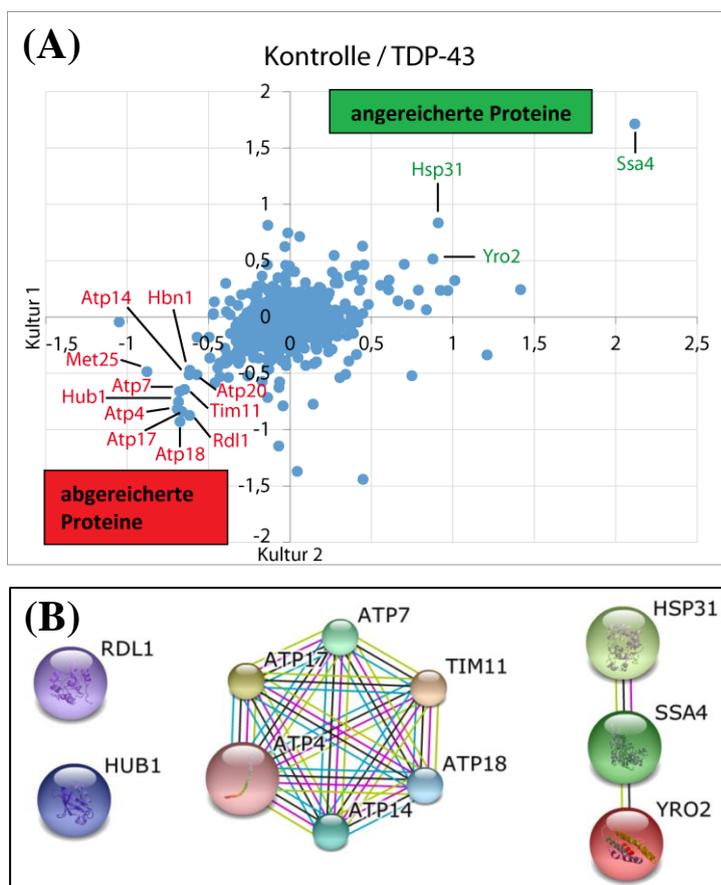
Die SILAC-Untersuchung ergab, dass bei der Expression von TDP-43 insgesamt 18 Proteine markant angereichert und 33 abgereichert wurden (Abb. 48). Zu den herunterregulierten Proteinen zählten einige ATP-Untereinheiten der mitochondrialen  $F_1F_0$ -Synthase (u. a. Atp4, 7, 14, 17 und 18), wohingegen die Hitzeschockproteine Ssa4 und Hsp31 heraufreguliert waren (Abb. 49A). Erstaunlicherweise zählen fast alle gefundenen ATP-Proteine zum sogenannten „Stängel“ (*stator*) der ATP-Synthase (Abb. 49B). Dieser ist nicht direkt an der katalytischen Funktion des Proteins beteiligt, sondern fixiert die  $F_1$ -Untereinheit und ermöglicht dadurch dessen Rotation (Xu *et al.* 2015).

Die vermehrte Expression verschiedener Hitzeschockproteine ist hingegen nicht überraschend (Abb. 49B). In mehreren Publikationen wurde die Bedeutung verschiedener



**Abb. 48: Durch TDP-43-Expression markant veränderte Proteine.** Dargestellt sind die x-fache An- oder Abreicherung von 18 bzw. 33 Proteinen im Vergleich zur Kontrolle beider biologischer Replikate (Mischkultur 1 und 2).

Hitzeschockproteine bei der TDP-43-Aggregation in der Zelle nachgewiesen (Chang *et al.* 2013, Udan-Johns *et al.* 2013). Es ist somit zu vermuten, dass die Zelle auf Stress in Form von TDP-43-Anreicherung mit der verstärkten Produktion von Hitzeschockproteinen reagiert. Bemerkenswert allerdings ist die Tatsache, dass Hsp31 neben der Beteiligung an der oxidativen Stressresistenz am diauxischen Shift und am Überleben in der stationären Phase mitwirkt. Ferner ist Hsp31 das Hefehomolog zum humanen DJ-1-Protein. DJ-1 wiederum wird mit der Parkinson-Erkrankung und Krebs in Verbindung gebracht (Wilson *et al.* 2004, Skoneczna *et al.* 2007, Hasim *et al.* 2014, Miller-Fleming *et al.* 2014).



**Abb. 49: Zusammenfassung der an- und abgereicherten Proteine und deren Interaktionen.** (A) Darstellung aller im SILAC-Experiment untersuchten Proteine. Gekennzeichnet sind einige besonders auffällige Proteine, wie Hsp31 oder Atp18. (B) Überblick der Interaktionen der ATP-Untereinheiten für die  $F_1F_0$ -Synthase und der Hitzeschockproteine Hsp31, Ssa4 und Yro2. Das Interaktionsnetzwerk wurde mit Hilfe der STRING-Datenbank erstellt ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)). Die farbigen Linien verdeutlichen die Art der Interaktion: pink steht für eine experimentell bestimmte Interaktion, bei hellblau wurden die Daten aus betreuten Datendanken entnommen, bei grün wurden die Interaktionen über eine Textanalysesoftware ermittelt und dunkelblau steht für eine Protein-koexpression.

## 5 Diskussion und Ausblick

### 5.1 Auswirkungen der TDP-43-Expression auf die Vakuole und die proteolytischen Kontrollmechanismen

#### 5.1.1 TDP-43 induziert die Autophagie

Der Funktionsverlust und die Anreicherung von zytoplasmatischem TDP-43 haben globale Auswirkungen auf die Physiologie der Zelle (siehe Abschnitt 1.2). Ein zusätzlicher Beweis für diese Aussage konnte in dieser Arbeit erbracht werden. Es wurde eine durch TDP-43-Expression verstärkte Autophagie beobachtet.

Die Autophagie ist ein konstitutiv stattfindender Mechanismus und erfolgt in geringem Umfang sogar unter nährstoffreichen Bedingungen (Baixauli *et al.* 2014, Wen und Klionsky 2016). Der in einem solchen Fall wirkende Cvt-Weg benötigt, ebenso wie die Stress-induzierte Autophagie, das Membranprotein Atg8 (Kirisako *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte, unter Zuhilfenahme des GFP-Atg8-Prozessierungsassays, gezeigt werden, dass TDP-43 eine Anreicherung des Fusionsproteins GFP-Atg8 sowohl in wildtypischen als auch in  $\Delta atg1$  Zellen im nährstoffreichen Zustand zur Folge hat (nur beim Deletionsstamm signifikant; Abb. 24). Auf Grund der Tatsache, dass das GFP-Atg8-Konstrukt durch einen endogenen Promoter reguliert wird, kann vermutet werden, dass die TDP-43-Expression die Synthese von autophagischen Genen frühzeitig in einer Phase stimuliert, in der so gut wie keine Autophagie stattfindet.

Weitere Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot konnten die Annahme erhärten, dass TDP-43 ein positiver autophagischer Regulator darstellt. So wurde keine zytoplasmatische Akkumulation von GFP-Atg8 in TDP-43-synthetisierenden Zellen beobachtet, welches auf eine Störung des autophagischen Flusses hingewiesen hätte (Abb. 22). Vielmehr führte die Expression von TDP-43 zu einer Beschleunigung des autophagischen Flusses. Diese konnte infolge der verstärkten vakuolären Prozessierung von GFP-Atg8 zu GFP im Western Blot belegt werden (Abb. 23). Die Forcierung der Autophagie erfolgte sowohl unter nährstoffreichen als auch unter nährstoffarmen Bedingungen. Das führt zu der Annahme, dass TDP-43 das autophagosomale System aktiviert, während es den endozytotischen Mechanismus hemmt (siehe Abschnitt 4.2.3).

Darüber hinaus legten die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate nahe, dass der autophagische Weg erst am Prozessende durch TDP-43 modifiziert wird. So wurde keine eindeutige Induktion der Autophagie auf Grundlage eines erhöhten Atg8-PE/Atg8-Verhältnisses bei der Expression von TDP-43 im Wildtyp beobachtet (Abb. 25).

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von publizierten Beobachtungen, die eine Aktivierung der Autophagie zum Beginn des Prozesses beschrieben (Wang *et al.* 2015A, 2015B). Die Autoren zeigten in verschiedenen Publikationen, dass die Expression von wildtypischem, mutiertem (A315T) oder fragmentiertem TDP-43 (25 kDa Fragment) in SH-SY5Y-Zellen zu einem signifikanten Anstieg von Beclin-1 (Vps30 Homolog, PI3K-Untereinheit) und des LC3-II/LC-I-Verhältnisses führte. LC3-II und LC-I sind das humane Äquivalent zu Atg8-PE und Atg8 in der Hefe. Die Zunahme von LC3-II und Beclin-1 kann dadurch begründet werden, dass die Autophagie induziert wird. Allerdings ist es auch möglich, dass die Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole gestört ist. Aus diesem Grund ist die Anreicherung von beiden autophagischen Markern nicht mit einer gesteigerten Autophagierate gleichzusetzen. Ausschließlich die Prozessierung in der Vakuole/ im Lysosom lässt diese Vermutung zu.

Eine solche Untersuchung führten Xia *et al.* (2015) durch. Sie analysierten die Auswirkungen einer TDP-43-Depletion auf die Autophagie in verschiedenen Zellarten und in der Fliege. Die Verfasser konnten, ähnlich wie Wang und Mitarbeiter (2015A, 2015B), eine Anreicherung von Beclin-1 und LC3-II feststellen. Ein Anstieg der Autophagosomenanzahl wurde optisch verifiziert. Neben der Induktion der Autophagie wurde eine Reduktion des autophagischen Stroms, bedingt durch die gehemmte Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom, beobachtet.

Die Tatsache, dass TDP-43 in den autophagischen Prozess eingreift, wurde ferner von Bose *et al.* (2011) belegt. Die Wissenschaftler konnten nachweisen, dass TDP-43 das Autophagie-relevante Protein Atg7 reguliert. Durch das Einbringen von siRNA wurde die TDP-43-Expression in Neuro2a Zellen gemindert und eine Depletion des neurotoxischen Proteins hervorgerufen. Der Verlust führte zur Abnahme von Atg7 auf mRNA- und Proteinebene. Der Rückgang des Proteins korrelierte mit der Reduktion der Autophagie und der Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen in den Zellen. Bose *et al.* (2011) sahen einen direkten Zusammenhang zwischen dem nukleären Funktionsverlust von TDP-43, der Störung der Autophagie, bedingt durch die Abnahme von Atg7 und einer Fehlregulation der Proteinhomeostase, die zu einer Proteinanreicherung führte. Solche Proteinablagerungen sind ein charakteristisches Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen, wie etwa der ALS. Daher ist es nicht überraschend, dass Mäuse mit fehlendem Atg7 in ihren Neuronen polyubiquitinierte, akkumulierte Proteine und Symptome für Neurodegeneration aufwiesen (Komatsu *et al.* 2006).

Aber nicht nur Atg7 wird durch TDP-43 beeinflusst, sondern auch andere, für die Autophagie bedeutsame Komponenten. Zu nennen wären hierbei VCP und HDAC6. Bei letzterem handelt

es sich um eine Histondeacetylase, die an der Eliminierung von Proteinaggregaten durch die Forcierung des autophagischen Abbaus beteiligt ist (Iwata *et al.* 2005, Boyault *et al.* 2007, Pandey *et al.* 2007, Lagier-Tourenne 2010, Lee *et al.* 2010). Die mRNA von HDAC6 wird durch TDP-43 stabilisiert (Kim *et al.* 2010, Ratti und Bugatti 2016). Fiesel *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Depletion von TDP-43 durch den Einsatz von siRNA in HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen sowie in *Drosophila* eine Herabregulation von HDAC6 zur Folge hat. Dies wiederum förderte die Proteotoxizität, welche möglicherweise ein Baustein in der neurodegenerativen Pathogenese darstellt. Allerdings scheinen auch TDP-43-Oligomere, welche durch ROS induziert wurden, das Proteinlevel der Histondeacetylase zu beeinflussen. Chang und Koautoren (2013) zeigten in HEK293T-Zellen, dass sowohl Vollängen als auch mutiertes TDP-43 die Synthese von HDAC6 markant reduziert. Das neurotoxische Protein reguliert damit nachweislich die Autophagiekomponente und könnte dadurch indirekt den autophagosomalen Prozess drosseln.

Interessanterweise ist HDAC6 mit VCP (Cdc48 in der Hefe) assoziiert (Boyault *et al.* 2006, Fiesel und Kahle 2011). VCP ist eine AAA-ATPase, die ubiquitinierte Proteine erkennt und deren Abbau über das UPS, die Autophagie oder den endosomal-lysosomalen Weg reguliert wird (Romisch 2006, Rumpf und Jentsch 2006, Ju *et al.* 2009, Ritz *et al.* 2011, Ling *et al.*, 2013, Ajroud-Driss und Siddique 2015). Der Verlust von VCP resultiert in der Akkumulation von Autophagosomen. Das ALS-assoziierte Gen wird durch TDP-43 gebunden, wodurch dessen Expression durch noch nicht näher definierte Mechanismen reguliert wird (Polymenidou *et al.* 2011 (Supplemente), Fiesel *et al.* 2010, Ling *et al.* 2013). Die Depletion von TDP-43 korreliert mit einer Reduktion des VCP mRNA-Levels (Fiesel *et al.* 2010). Insofern ist es möglich, dass eine pathologische Abnahme von TDP-43 und damit verbunden ein Funktionsverlust des Proteins die Autophagie indirekt über VCP drosselt und eine Anreicherung von fehlgefalteten toxischen Proteinen induziert. Dies wiederum könnte den Zelltod und die Neurodegeneration beschleunigen.

Alle diese Veröffentlichungen zeigen, dass TDP-43 auf Grund der nukleären Regulation von verschiedenen Autophagie-relevanten Proteinen am proteolytischen Abbauprozess beteiligt ist. Allerdings stützten sich viele Ergebnisse ausschließlich auf den Funktionsverlust von TDP-43. Bei den meisten neurodegenerativen Erkrankungen, wie etwa bei der ALS, sind jedoch die TDP-43-positiven Proteinablagerungen charakteristisch. Bereits Woerner *et al.* (2016) konnten beweisen, dass Proteinaggregate im Zytoplasma, darunter auch fragmentiertes TDP-43, den nukleären Import und Export von Proteinen sowie mRNAs stören.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Autophagie-induzierende Wirkung von TDP-43 (siehe Abschnitt 4.2.2) ist ein neuer Aspekt in der TDP-43-Pathogenese. Sowohl für die Steigerung des Autophagieprozesses, als auch für dessen frühzeitige Aktivierung, gibt es keine publizierte Datenlage. Ferner wurden überwiegend die Auswirkungen der TDP-43-Depletion auf den Abbaumechanismus untersucht. Jedoch wäre es eine Bereicherung zum Verständnis der Pathogenese, wenn gezeigt werden könnte, dass ebenso zytoplasmatisch akkumuliertes TDP-43 Komponenten der Autophagie beeinflusst. Zumal eine verminderte oder extrem erhöhte Autophagieleistung nachweislich zu Neurodegeneration beiträgt (siehe Abschnitt 1.4.2.5). Aus diesen Gründen sollten weitere Anstrengungen, sowohl in Hefe als auch in höheren Modellorganismen unternommen werden, um die Rolle von TDP-43 bei der Autophagieregulation zu analysieren.

Möglicherweise kann der Anstieg des Autophagieprozesses und die vermehrte Induktion bei nährstoffreichen Bedingungen auch auf die Hemmung des endosomal-vakuolären Wegs durch TDP-43 zurückgeführt werden.

### 5.1.2 TDP-43 stört den endosomal-vakuolären Weg

Die Beeinträchtigung des endosomal-vakuolären Prozesses auf Grund der Expression von TDP-43 konnte durch folgende Beobachtungen belegt werden: zum einen war der vakuoläre Abbau der endozytotischen Substrate Lucifer Yellow und Ste3-GFP reduziert (Abb. 26 und 27). Bei beiden Markern war eine signifikante Abnahme des vakuolären Signals und eine Anreicherung von peri-vakuolären zytoplasmatischen Punkten erkennbar. Zum anderen behinderte TDP-43 die Prozessierung des MVB-Substrats Sna3-GFP in der Vakuole. Sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch biochemisch war eine Anreicherung des Fusionsproteins zu beobachten (Abb. 28 und 29).

Allerdings legen nicht nur die eigenen Resultate nahe, dass TDP-43 in den endosomal-vakuolären Mechanismus eingreift, sondern auch wissenschaftliche Publikationen. Schenk und Mitarbeiter (2016) verwendeten siRNA um das Level von TDP-43 in primären Neuronen zu reduzieren und eine Hemmung des endosomal Rücktransports von Endosomen zur Plasmamembran zu induzieren. Die Abnahme in der Anzahl und in der Beweglichkeit der recycelnden Endosomen wurde auf eine verstärkte Expression von Vps4B während der TDP-43-Depletion zurückgeführt. Auf Grund des Mangels an Oberflächenrezeptoren atrophierten die Dendriten, welches zum Absterben der Neuronen und zu Neurodegeneration führte. Interessanterweise konnten Schenk *et al.* eine gesteigerte Beweglichkeit der MVBs

feststellen, welches für einen vermehrten Abbau von essentiellen Proteinen bei gleichzeitiger TDP-43-Reduktion sprechen würde.

Ferner diskutierten mehrere Autoren die Verbindung der Autophagie mit dem endosomal-vakuolären Mechanismus. Allerdings erfolgte dies ausschließlich im Zusammenhang mit einer simultanen funktionellen Störung beider Prozesse (Filimonenko *et al.* 2007, Lee *et al.*, 2007, Rusten *et al.* 2007, Lee und Gao 2009, Oshima *et al.* 2016). Das wurde oftmals damit begründet, dass die MVBs mit den Autophagosomen vor der Fusion mit dem Lysosom zu Amphisomen verschmelzen können (Rusten *et al.* 2007, Wong und Cuervo 2010, Baixauli *et al.* 2014, Huber und Teis 2016). Jedoch existieren diese Kompartimente in der Hefe nicht, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, beide Wege getrennt zu betrachten.

Die in dieser Arbeit beschriebene negative Regulation des endosomal-vakuolären Systems durch die Synthese von TDP-43 ist möglicherweise auf zwei Ursachen zurückzuführen. Erstens könnte die Überexpression von TDP-43 im Hefemodell die Mobilität der MVBs einschränken. Eine Vermutung, die auf Grund der Beobachtungen von Schenk *et al.* (2016) in Betracht kommt. Die reduzierte Beweglichkeit der MVBs würde schwere zelluläre Schäden hervorrufen. Diese könnten z. B. durch eine dezimierte Vakuolenfunktion (Mangel an Hydrolasen), eine Fehlregulation der Plasmaproteine oder eine gesteigerte Proteinakkumulation hervorgerufen werden. Der zelluläre Verlust würde die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Zytotoxizität bei den endozytotischen Deletionsstämmen während der Expression von TDP-43 erklären (siehe Abschnitt 4.1.4). Eine zweite mögliche Ursache für die Störung des endosomal-vakuolären Prozesses könnte die Bindung oder Behinderung von endozytotischen Komponenten durch die zytoplasmatischen TDP-43-positiven Aggregate sein (siehe Woerner *et al.* 2016). Infolgedessen wird die Autophagie, als kompensatorischer Mechanismus, induziert.

Die hier beschriebenen gegensätzlichen Auswirkungen der TDP-43-Expression auf die proteolytischen Wege wurden zuvor in keinem wissenschaftlichen Artikel beschrieben. Das Augenmerk sollte deswegen vermehrt auf das endosomal-vakuoläre System als Eliminierungsweg für TDP-43 gerichtet werden, da dessen Hemmung durch TDP-43 den eigenen Abbau sowie den vieler weiterer Proteine (siehe *Sna3* und *Ste3*) bedingt (siehe Abschnitt 4.2.3). Dieser proteolytische Mechanismus ist höchstwahrscheinlich am neurodegenerativen Prozess beteiligt.

Die vermeintliche Beeinträchtigung der ESCRT-Komponenten durch TDP-43 wäre auch eine mögliche Erklärung für die Fragmentierung der Vakuole.

### 5.1.3 TDP-43 führt zur Fragmentierung der Vakuole

Dass TDP-43 die Funktion, die Morphologie und die Lokalisation von Organellen, wie den Mitochondrien und dem Golgi-Apparat, in der Zelle verändert, konnten bereits mehrere Studien belegen (Fujita *et al.* 2008, Shan *et al.* 2010, Tong *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013, Magrané *et al.* 2014, Sundaramoorthy *et al.* 2015). So waren beispielweise die Länge der Mitochondrien signifikant reduziert oder das Golgi-Netzwerk fragmentiert (Fujita *et al.* 2008, Tong *et al.* 2012, Magrané *et al.* 2014).

Die Vakuole, als hoch dynamisches Organell, ermöglicht es der Zelle auf extrazelluläre Signale und Umwelteinflüsse zu antworten. So können Hungerphasen durch den Abbau von Zellkomponenten überdauert und Signale durch die Regulation der Rezeptoren gesteuert werden (Ostrowicz *et al.* 2008). Jedoch handelt es sich bei der Vakuole auch um ein empfindliches Kompartiment, welches auf Stress in Form von Fragmentierung reagiert. Solche morphologischen Veränderungen können u. a. durch osmotische Bedingungen und verschiedene Proteine (u. a. TORC1) induziert werden (Li und Kane 2009, Michailat *et al.* 2012, Stauffer und Powers 2015). Die Expression von TDP-43 in der Hefe hatte eine solche vakuoläre Fragmentierung zur Folge.

Die Bestimmung der Vakuolenanzahl erfolgte durch die Verwendung der Farbstoffe Lucifer Yellow und CMAC. Beide belegten einen signifikanten Anstieg der Vakuolenanzahl bei der Synthese von TDP-43 (Abb. 15 und 16). Bemerkenswert war hierbei, dass die Dauer der Expression mit der Fragmentierung des Kompartiments korrelierte (Abb. 18). Es konnten eindeutig mehr Vakuolen pro Zelle vom Festmedium als vom Flüssigmedium bestimmt werden. Ferner wiesen die ALS-assoziierten TDP-43-Varianten Q331K und M337V nicht nur eine verstärkte Zytotoxizität im Tüpfeltest auf, sondern besaßen auch auffällig mehr Vakuolen (Abb. 17 und 21). Die vorliegenden Resultate bewiesen: TDP-43 verändert die vakuoläre Morphologie (siehe Abschnitt 4.2.1).

Aber wie ist diese Vakuolenfragmentierung zu erklären? Sowohl Seeley *et al.* (2002) als auch Michailat und Mayer (2013) konnten in großen Hefescreens zeigen, dass Mutanten für die vakuoläre Proteinsortierung (ESCRTs) und die Vakuolenfusion zu einer starken Fragmentierung des Organells beitrugen. Beispiele hierfür waren Mvb12, Vps36, Snf7, Bro1, Ypt1, Vam3 und alle HOPS-Untereinheiten. Michailat und Mayer (2013) spekulierten, dass die ESCRTs auf Grund ihrer Fähigkeit, die Plasmamembran zu verformen und zu trennen, ebenso in der Lage wären, die Vakuole direkt zu fragmentieren.

Eine weitere mögliche Ursache für die vakuoläre Fragmentierung lieferten Wang *et al.* (2011). Die Autoren exprimierten in der Hefe das mutierte Plasmamembranprotein Wsc1\*-

6R, welches auf Grund seiner Modifikationen nicht in die MVBs einsortiert werden konnte. Infolgedessen wurde das Protein in toxische Spaltprodukte prozessiert, die eine Fragmentierung der Vakuole und eine erhöhte Zytotoxizität zur Folge hatten.

Auf Grundlage dieser Veröffentlichungen ergeben sich zwei Möglichkeiten, wie TDP-43 die Vakuolenmorphologie verändert. Entweder direkt, durch die Spaltung in toxische Spaltprodukte oder indirekt, indem die zytoplasmatischen TDP-43-Aggregate die ESCRT-Komponenten in ihrer Funktion stören und dadurch die vakuoläre Fragmentierung induzieren. Auch eine Beeinträchtigung von fusionsrelevanten Proteinen durch TDP-43 wäre möglich. Das dadurch entstehende Ungleichgewicht zwischen vakuolärer Teilung und Fusion würde die beobachtete Vakuolenfragmentierung erklären. Die Menge an akkumuliertem TDP-43 könnte hierbei mit der vakuolären Fragmentierung zusammenhängen. Dies würde die deutlich erhöhte Anzahl an Vakuolen pro Zelle in den ALS-assoziierten TDP-43-Varianten Q331K und M337V erklären, die nachweislich mehr Aggregate pro Zelle gegenüber dem Wildtyp aufweisen (Johnson *et al.* 2009).

Eine Fragmentierung der Vakuole bzw. des Lysosoms durch Expression von TDP-43 wurde bis dato in keiner Publikation untersucht oder beschrieben. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bilden einen potenziell neuen Aspekt im TDP-43-Krankheitsbild. Eine gründliche Erforschung des Organells im Zusammenhang mit TDP-43 ist u. a. dadurch sinnvoll, da fehlgefaltete und aggregierte Proteine, wie TDP-43, über die Vakuole eliminiert werden.

## 5.2 Beteiligung proteolytischer Abbauwege an der Eliminierung von TDP-43

### 5.2.1 TDP-43 ist kein primäres Substrat des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS)

Das UPS ist ein wichtiger zellulärer Proteinqualitätskontrollmechanismus, um fehlgefaltete oder aggregierte Proteine aus der Zelle zu entfernen (siehe Abschnitt 1.4.1). Auf Grund dessen ist es möglich, dass auch TDP-43 über das UPS abgebaut wird.

Mit Hilfe des Tüpfeltestscreens konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des UPS eine Verstärkung der TDP-43-verursachten Zytotoxizität bedingt. Beide UPS-Deletionsstämme,  $\Delta ubi4$  und  $\Delta rpn4$  (*RPN4* codiert für einen Transkriptionsfaktor (Finley *et al.* 2012) und *UBI4* für Stress-reguliertes Ubiquitin (Ozkaynak *et al.* 1987)), zeigten ein vermindertes Wachstum während der Expression von TDP-43 gegenüber dem Wildtyp (Abb. 11). Die TDP-43-Toxizität war in den Stämmen, denen sowohl ein Gen für das UPS als auch für die

Autophagie fehlte, nicht erhöht. Die Doppeldeletionsstämme  $\Delta atg1\Delta ubi4$  bzw.  $\Delta atg1\Delta rpn4$  besaßen ein ähnliches Wachstumsdefizit wie die UPS-Einfachdeletionsstämme (Abb. 38). Aus den Ergebnissen des Tüpfeltests kann geschlussfolgert werden, dass das UPS, aber nicht die Makroautophagie, die TDP-43-verursachte Zytotoxizität mutmaßlich reduziert. Dies könnte daran liegen, dass TDP-43 über das UPS abgebaut wird.

Mittels der Western Blot Analyse wurde die Abbaurate von TDP-43 im UPS-Deletionsstamm  $\Delta rpn4$  untersucht. Das TDP-43-Level sank in ähnlicher Weise wie im Wildtyp (Abb. 39). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das UPS unter den gegebenen Bedingungen keine ausschlaggebende Rolle beim TDP-43-Abbau spielt.

Diese Erkenntnis ist verblüffend, da mehrere Autoren das UPS als wichtigen Eliminierungsweg für TDP-43 beschrieben. Bereits Wang *et al.* (2010) dokumentierten in Zellkulturlinien einen Anstieg von exogenem und endogenem TDP-43 sowie von TDP-25 (prozessiertes TDP-43-Fragment) bei der Hemmung des UPS. Des Weiteren förderte die verminderte UPS-Aktivität die Aggregatbildung von exogenem TDP-43 im Zellkern und von TDP-25 im Zytoplasma.

Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten Zhang und Mitarbeiter (2010). Sie analysierten die Auswirkungen der pharmakologischen UPS-Inhibition auf das C-terminale TDP-43-Fragment TDP<sub>220-414</sub> in der Neuroblastomazelllinie M17D3. Sie beobachteten eine sowohl biochemische als auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Anreicherung des Proteingehalts. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass das C-terminale Fragment bevorzugt über den proteasomalen Mechanismus abgebaut wird.

Van Eersel *et al.* (2011) erforschten primäre Neuronen auf die Lokalisation und die posttranslationale Veränderung von TDP-43 bei einem eingeschränkten UPS. Die Wissenschaftler stellten eine signifikante zytoplasmatische Akkumulation von TDP-43 bei einer gleichzeitigen nukleären Depletion fest. Ferner begünstigte die UPS-Blockierung die Unlöslichkeit, die Phosphorylierung und die Ubiquitinierung des Proteins. Die gewonnenen Daten stellten einen starken Bezug zwischen der Rolle des Proteasoms bei der Lokalisation und Modifikation von TDP-43 sowie der möglichen Krankheitsrelevanz her.

Die Resultate von 2010 und 2011 wurden 2014 von zwei weiteren Arbeitsgruppen bestätigt und erweitert. So zeigten Scotter *et al.* (2014), dass die chemische Inhibierung des UPS das TDP-43-Level in HEK293- und SH-SY5Y-Zellen steigerte. Darüber hinaus kam es zur Bildung von zytoplasmatischen, Ubiquitin- und TDP-43-positiven Makroaggregaten und zum Zelltod. Bei einer Wiederherstellung des proteolytischen Wegs lösten sich die TDP-43-Aggregate bei den Zellen wieder auf, die die Hemmung überlebten und das relative TDP-43-

Level in den Zellen sank. Die Autoren stellten die Vermutung auf, dass lösliches, monomeres TDP-43 primär über das UPS abgebaut wird.

Vergleichbar mit anderen Forschungsgruppen untersuchten Huang und Mitarbeiter (2014) in Neuro2a-Zellen die Auswirkungen des UPS auf TDP-43. Die Wissenschaftler konnten eine Anreicherung der Zellen mit TDP-43-Aggregaten sowie eine Steigerung des Proteinlevels für TDP-43 und seiner Spaltprodukte bei der pharmakologischen Blockierung des UPS nachweisen. Weiterhin zeigten Huang *et al.* (2014), dass das neurotoxische Protein vorrangig, vor der Chaperon-vermittelten Autophagie und der Makroautophagie, über das UPS abgebaut wird.

Nichtdestotrotz liegen publizierte Studien vor, die keinen Zusammenhang zwischen dem UPS und dem Abbau von TDP-43 feststellten. Zwar demonstrieren Urushitani *et al.* (2010) in Zellkulturexperimenten, dass wildtypisches und mutiertes TDP-43 während der UPS-Hemmung in der unlöslichen Zellfraktion und im Zytoplasma akkumulierten. Jedoch hatte die Inhibierung keine Auswirkungen auf die zeitnahe Entfernung beider TDP-43-Formen. Die Eliminierungsraten waren mit denen von unbehandelten Zellen vergleichbar.

Wie jedoch ist die erhöhte TDP-43-Zytotoxizität im Tüpfeltestscreen bei den UPS-Deletionsstämmen zu erklären, wenn nicht durch eine Anreicherung von TDP-43? Eine Antwort darauf könnten die Beobachtungen von Hebron und Mitarbeiter (2013) geben. Sie zeigten, dass die TDP-43-Expression die Proteasomfunktion in M17-Neuroblastomazellen und im Gehirn von Ratten signifikant reduziert. Eine eingeschränkte proteasomale Aktivität hat gravierende Auswirkungen auf die Zellgesundheit (siehe Abschnitt 1.4.1). Daher kann die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion des Zellwachstums vermutlich auf eine TDP-43-bedingte Blockierung des UPS und eine dadurch hervorgerufene unerwünschte Akkumulation von anderen Proteinen zurückgeführt werden.

Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden: die UPS-Hemmung fördert die TDP-43-bedingte Zytotoxizität. Jedoch ist das UPS mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht der primäre TDP-43-Abbaumechanismus. Andere proteolytische Mechanismen, wie die Autophagie oder der endosomal-vakuoläre Weg, könnten vorrangig an der Entfernung von TDP-43 in der Hefe beteiligt sein (siehe Abschnitt 5.2.2 und 5.2.3).

## 5.2.2 TDP-43 ist kein primäres Substrat der Autophagie

Der autophagosomal-vakuoläre Weg ist eine weitere wichtige Möglichkeit der Zelle, zytoplasmatisches TDP-43 abzubauen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene

Autophagiedelektionsmutanten im Tüpfeltestscreen untersucht und mittels Western Blot bzw. Fluoreszenzmikroskopie spezifischer erforscht.

Von den insgesamt 44 ausgewerteten Deletionstämmen, denen Autophagie-relevante Gene fehlen, zeigte ca. die Hälfte ein vermindertes und die zweite Hälfte ein verbessertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp während der Expression von TDP-43 (Abb. 12 sowie Abb. VII und VIII im Anhang). Das Verhalten ähnelte sich am dritten und am sechsten Inkubationstag (siehe Tab. I und II. im Anhang). Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass die Autophagie in der Hefe keine primäre Bedeutung bei der Eliminierung von TDP-43 hat. Auch die Auswertung der Doppeldeletionsstämmen aus UPS und Autophagie zeigte keine drastische Veränderung des Wuchsverhaltens gegenüber den UPS-Einfachdeletionsmutanten (Abb. 38 und Abschnitt 4.3.2)

Die fluoreszenzmikroskopische und biochemische Analyse von  $\Delta atg1$  im Hungerexperiment ergab, dass weder die Anzahl der TDP-43-GFP-Aggregate, noch das zelluläre Level an TDP-43-GFP sich veränderte (Abb. 34, 35 und Anhang Abb. XI). Beides Indizien dafür, dass die Autophagie nicht vorrangig TDP-43 entfernt, da sonst der Deletionsstamm im Allgemeinen mehr TDP-43-GFP gegenüber dem Wildtyp aufgewiesen hätte.

Der Nachweis des Abbaupotenzials sowie der -geschwindigkeit von TDP-43 in Autophagie- und UPS-Einfach- bzw. Doppelsstämmen erfolgte biochemisch mit Hilfe der Western Blot Analyse (Abb. 39). Die Reduktion der Proteinlevel wurde über zwei Tage nach Abschaltung der TDP-43-Expression beobachtet. Ähnlich wie beim UPS-Deletionsstamm und beim Wildtyp war eine stetige Abnahme des Proteinlevels bei  $\Delta atg1$  messbar. Auch beim Doppeldeletionsstamm  $\Delta atg1\Delta rpn4$  war nach anfänglich leichter Zunahme (ca. 20%) eine drastische Reduktion des TDP-43-Levels feststellbar. Weder die Autophagie noch das UPS allein oder in Kombination zeigten eine Verzögerung in der TDP-43-Eliminierung oder eine Stabilisierung des Proteinlevels über den beobachteten Zeitraum. Daher ist zu vermuten, dass keiner der beiden proteolytischen Prozesse vorrangig eine Rolle beim TDP-43-Abbau spielt.

Allerdings könnte die Autophagie, wenn auch nicht primär, ein kompensatorischer Mechanismus zur Beseitigung von TDP-43 darstellen. Dafür spricht eine deutliche Überlagerung von 31% zwischen den Fusionsproteinen GFP-Atg8 und TDP-43-DsRed in einer fluoreszenzmikroskopischen Kolkalisationsstudie (Abb. 37). Um die These zu validieren, könnten Doppeldeletionsstämmen untersucht werden, bei denen sowohl die Autophagie als auch der endozytotische Prozess blockiert sind. Solche Stämme sollten deutlich mehr TDP-43-Aggregate aufweisen, als Stämme mit ausschließlich eingeschränkter Endozytose oder deletiertem MVB-Weg.

Der Effekt eines inhibierten bzw. induzierten autophagischen Mechanismus auf TDP-43 war Gegenstand zahlreicher Studien. Ju und Mitarbeiter (2009) stellten fest, dass die Hemmung der autophagosomalen Reifung die Menge an zytosolischem TDP-43 in U2OS Zellen verstärkte. Die pharmakologisch hervorgerufene autophagische Störung führte zur Akkumulation von TDP-43, welches ein charakteristisches Krankheitsmerkmal darstellt.

Caccamo *et al.* (2009) analysierten die Rolle der Autophagie beim TDP-43-Metabolismus in Neuro2a- und SH-SY5Y-Zellen. Sie stellten fest, dass die Autophagieinhibition eine Akkumulation von C-terminalem TDP-43-Fragmenten bedingte. Dagegen reduzierte die Induktion der Autophagie die Anreicherung des 25 kDa großen Proteinfragments und stellte die ursprüngliche nukleäre Lokalisation wieder her. Interessanterweise konnten die Wissenschaftler beim Volllängenprotein einen Abbau trotz autophagosomaler Blockierung feststellen. Darüber hinaus war der Rückgang des ungekürzten TDP-43-Proteins während der forcierten Autophagie nicht beschleunigt. Nichtsdestotrotz sahen die Verfasser in der autophagischen Induktion eine potenzielle therapeutische Möglichkeit, um TDP-43-Proteinopathien zu behandeln.

In Übereinstimmung mit Caccamo *et al.* (2009) konnten Wang und Koautoren (2012) zeigen, dass die Aktivierung des autophagosomalen Wegs generell positive Auswirkungen hatte. In einem FTL-D-U-Mausmodell verminderte sich durch die Autophagieinduktion die Anzahl der Zellen sowie die Menge der zytoplasmatischen, TDP-43-positiven Einschlüsse. Des Weiteren wurde im Zellextrakt eine Abnahme von Volllängen-TDP-43 sowie dessen Spaltprodukte festgestellt. Infolgedessen reduzierte sich der Neuronenverlust im Tiermodell so dass Lern-, Erinnerungs- und motorische Störungen abnahmen.

Barmada *et al.* (2014) zeigten protektive Effekte der Autophagie in primären murinen und humanen Neuronen. Die Wissenschaftler bewiesen, dass die pharmazeutische Induktion des autophagischen Wegs die TDP-43-Eliminierung steigerte, da sowohl das Level von wildtypischen als auch von mutiertem TDP-43 in den Zellen sank. Bei letzterem verringerte sich zusätzlich die Anzahl der Zellen mit TDP-43-Aggregaten. Die Menge an fehllokalisiertem Protein nahm ab. Die Verfasser schlossen daraus, dass die Aktivierung der Autophagie das Risiko für Zelltod senkt, das Überleben verbessert und Neurodegeneration mildert.

Viele Autoren betrachten die Autophagie und das UPS allerdings nicht getrennt voneinander, sondern beschreiben ein Ineinandergreifen beider proteolytischer Prozesse beim Eliminieren von TDP-43. Beispielsweise untersuchten Urushitani und Mitarbeiter (2010) nicht nur die Effekte der UPS-Hemmung auf das Verhalten von TDP-43, sondern auch die der reduzierten

Autophagie. Diese führte zu einer verzögerten Reduktion von wildtypischem und mutiertem TDP-43. Die Inhibierung beider Wege induzierte zudem TDP-43-Aggregate. Die Verfasser argumentierten, dass sowohl die Autophagie wie auch das UPS am TDP-43-Abbau beteiligt sind.

Zu ähnlichen Resultaten gelangten Wang *et al.* (2010), Scotter *et al.* (2014) und Huang *et al.* (2014). Erstere analysierten neben den Folgen des eingeschränkten UPS auch die der autophagischen Blockierung auf die Entfernung von TDP-43. Diese verursachte, ähnlich wie bei der proteasomalen Inhibition, einen Anstieg des Proteinlevels von exogenem TDP-43 und besonders von TDP-25 in den HEK293-Zellen. Die autophagische Steigerung hingegen verringerte den Gehalt beider Proteinarten. Sowohl das UPS als auch die Autophagie werden zur Eliminierung von TDP-43 und seiner Spaltprodukte benötigt.

Bei Scotter und Mitarbeitern (2014) führte die chemische autophagosomale Hemmung zum Anstieg des TDP-43-Levels. Parallel dazu senkte eine Forcierung die Proteinmenge im Zytoplasma. Die Autoren stellten die These auf, dass monomeres TDP-43 primär über das UPS abgebaut wird. Der autophagische Prozess hingegen eliminiere vorrangig aggregiertes TDP-43, d.h. besonders Oligomere und Mikroaggregate. Außerdem sei die Autophagie nicht in der Lage, eine Störung des UPS vollständig zu kompensieren.

Neben dem UPS wurden bei Huang *et al.* (2014) die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) und die Makroautophagie untersucht. Analog zum reduzierten UPS förderte die verminderte proteolytische Aktivität der Makroautophagie und der CMA das Level von exogenem TDP-43 und dessen Spaltprodukten. Ferner war die Zellanzahl mit exogenen TDP-43-positiven Aggregaten erhöht. Diese pathophysiologischen Merkmale waren allerdings weniger prägnant ausgeprägt als bei einem blockierten UPS. Die Wissenschaftler entwarfen das Modell, dass das Volllängenprotein direkt über UPS, CMA oder Makroautophagie abgebaut oder zunächst gespalten und anschließend eliminiert wird. Letzteres gilt als Hauptabbauweg für TDP-43.

Watabe *et al.* (2014) analysierten die Auswirkungen einer UPS-, Autophagie- oder ESCRT-Inhibition auf das Aggregationsverhalten von TDP-43. Durch das Einbringen von shRNA in verschiedene Zelltypen reduzierten sie die Aktivität eines der drei proteolytischen Systeme. Die Kotransfektion mit wildtypischem oder mutiertem TDP-43 zeigte eine Steigerung der Aggregation im Vergleich zu den Zellen ohne shRNA-Behandlung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass alle drei Prozesse am Abbau von TDP-43 beteiligt sind.

Die überwiegende Mehrheit der Studien zeigte, dass nicht nur die Autophagie, sondern auch das UPS, ebenso wie der endosomal-vakuoläre Weg an der Reduktion von TDP-43 beteiligt

sind. Dafür spricht ebenso die Tatsache, dass TDP-43 sowohl mit Autophagie als auch mit UPS-Komponenten kolokalisiert. Beispiele dafür lieferten u. a. Kim *et al.* (2009), Urushitani *et al.* (2010), Wang *et al.* (2010) und Scotter *et al.* (2014). Sie sahen eine Überlagerung von TDP-43 bzw. TDP-25 mit Ubiquilin 1 (Cochaperon, welches ubiquitinierte Proteine dem autophagischem oder proteasomalen Abbau zuführt), p62 (Ubiquitin-bindendes Protein für die selektive Autophagie) und LC3 (Autophagiemarker).

Eine Kolokalisation zwischen TDP-43 und Atg8 (LC3 Homolog) konnte ebenso in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden (Abb. 37). Dies spricht für eine Beteiligung der Autophagie am TDP-43-Eliminierungsmechanismus. Jedoch ist diese wahrscheinlich nur kompensatorisch, da das Level an TDP-43 trotz autophagischer Hemmung kontinuierlich abnahm, keine Akkumulation von TDP-43-GFP-Aggregaten sowie kein Anstieg im TDP-43-GFP-Level festzustellen war. Diese Resultate unterscheiden sich größtenteils zu vielfach publizierten Beobachtungen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit eröffnen die in Publikationen kaum berücksichtigte Möglichkeit, dass der endosomal-vakuoläre Abbauweg das entscheidende System zur Eliminierung von TDP-43 darstellt.

### 5.2.3 TDP-43 ist ein Substrat des endosomal-vakuolären Abbauwegs

Ein weiterer zellulärer Schutzmechanismus, um potenziell toxisches TDP-43 zu eliminieren, ist der endosomal-vakuoläre Weg.

Im Tüpfeltestscreen wurden insgesamt 18 Komponenten für die frühe Endozytose und den MVB-Weg untersucht (Abb. 13). Drei der Deletionsstämme zeigten einen verbesserten, zwei einen ähnlichen und 13 einen verschlechterten Wuchs gegenüber dem Wildtyp während der Expression von TDP-43 (Tag 3). Besonders die MVB-Deletionsstämme wuchsen mit 81% mehrheitlich schlechter als der Kontrollstamm (Tag 3). Einer der drei deletierten Stämme mit einem positiven Wachstumsindex war  $\Delta npr1$  (0,528 an Tag 3 und 1,00 an Tag 6). Im Gegensatz zu den übrigen Mutanten bedingt die Deletion von *NPR1* eine Induktion der Endozytose (siehe Abschnitt 4.1.4). Diese Beobachtung deckt sich mit der Vermutung, dass die frühe Endozytose möglicherweise und der MVB-Weg mit großer Wahrscheinlichkeit an der Eliminierung von TDP-43 beteiligt sind.

Belege hierfür lieferten die zwei MVB-Deletionsstämme  $\Delta vps24$  und  $\Delta vps25$  sowie der Deletionsstamm für die Endozytose  $\Delta npr1$ . Die fluoreszenzmikroskopische Analyse offenbarte einen signifikanten Anstieg an TDP-43-GFP-Punkten in den beiden MVB-Stämmen während des Hungerns. Beim  $\Delta npr1$ -Stamm konnte eine Abnahme der TDP-43-GFP-Aggregate zwischen sechs und 24 Stunden festgestellt werden. Allerdings

reduzierte sich die Anzahl der TDP-43-Aggregate im selben Zeitraum im Wildtyp. Eine Beteiligung der frühen Endozytose kann auf Grund der Datenlage nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jedoch scheinen die MVBs mutmaßlich am Abbau von TDP-43 beteiligt zu sein.

Mittels Kollokalisationsstudien konnte verifiziert werden, dass TDP-43 ein Substrat des endosomal-vakuolären Prozesses darstellt. Es wurde eine ca. 17%ige Überlagerung zwischen TDP-43-DsRed und dem MVB-Substrat Sna3-GFP im Wildtyp beobachtet (Abb. 42).

Dass der endosomal-vakuoläre Weg am Entfernen von neurotoxischen Proteinen beteiligt ist, zeigt sich an den Beispielen von APP (Amyloid-Vorläuferprotein) und  $\alpha$ -Synuclein. Die Akkumulation von APP sowie dessen Spaltprodukt A $\beta$ 42 in extrazelluläre amyloide Plaques ist ein charakteristisches histopathologisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit (Edgar *et al.* 2015). Intrazellulär sind beide Proteine in der Nähe der MVBs lokalisiert (Takahashi *et al.* 2002, Morel *et al.* 2013). 2002 erforschten Takahashi und Mitarbeiter Gehirnschnitte von Mäusen, Ratten und Menschen. Hierbei stellten sie fest, dass bereits im gesunden Gehirn A $\beta$ 42 vor allem an der MVB-Membran akkumulierte. Diese Anreicherung nahm im Alter, besonders in den Dendriten, zu. Die Verfasser spekulierten, dass A $\beta$ 42 durch die MVBs transportiert wird, deren Struktur schädigt und dadurch vermehrt ins Zytosol strömt oder den Transport der MVBs beeinträchtigt. Beides könnten kritische neurotoxische Ereignisse im Krankheitsverlauf von Alzheimer-Erkrankung darstellen. Morel *et al.* (2013) bewiesen in HeLa-Zellen und Neuronen, dass APP ebenso in die intraluminalen Vesikel (ILV) der MVBs einsortiert wird. In H4-Zellen zeigten Edgar und Mitarbeiter (2015), dass ein Teil des Vorläuferproteins über die MVBs zu den Lysosomen transportiert und dort abgebaut wird. Die Depletion der ESCRT-Komponenten Hrs (Hefehomolog ist Vps27) bzw. Tsg101 (Hefehomolog ist Vps23) führte zur Abnahme von APP in den ILVs sowie in den Lysosomen. Darüber hinaus stieg das intrazelluläre Level an A $\beta$  und dessen Sekretion nahm dramatisch ab. Die Autoren vermuten eine duale Rolle der MVBs. Zum einen führen sie APP und dessen Spaltprodukte dem lysosomalen Abbau zu. Zum anderen unterstützen sie die Abgabe von A $\beta$  aus der Zelle.

Tofaris und Koautoren (2011) bewiesen, dass  $\alpha$ -Synuclein über den endosomal-lysosomalen Weg eliminiert wird. Das vor allem im Gehirn angereicherte Protein bindet Membranlipide und ist am Recycling von präsynaptischen Vesikeln beteiligt. Bei der Parkinson-Erkrankung und anderen  $\alpha$ -Synucleinopathien akkumuliert das Protein in intraneuronalen, oftmals ubiquitinierten Einschlüssen, sogenannten Lewy bodies (Tofaris *et al.* 2011). Als experimentelle Grundlage für die Untersuchung von  $\alpha$ -Synuclein dienten hier SH-SY5Y- und

HEK293-Zellen, Hefe sowie humane Gehirnschnitte. Die Wissenschaftler konnten feststellen, dass die durch siRNA herbeigeführte Tsg101-Depletion die Eliminierung des Membranproteins stark reduzierte. Die Verfasser schlossen daraus, dass  $\alpha$ -Synuclein mit Hilfe der MVBs in die Lysosomen gelangt und dort abgebaut wird.

Eine Beeinträchtigung des endosomal-vakuolären Wegs hat dramatische Auswirkungen auf den Proteinhaushalt der Zelle und ist überdies krankheitsrelevant. Skibinski *et al.* (2005) studierten eine große dänische Familie mit 450 Mitgliedern aus sechs Generationen. Bei 11 Angehörigen wurde FTD diagnostiziert. Grund für den Krankheitsausbruch war eine Mutation im CHMP2B Gen (*CHarged Multivesicular body Protein 2B*, Vps2 bei Hefe). Die Verfasser konnten nachweisen, dass eine Transition von Guanin zu Cytosin an der Akzeptorspleißstelle von Exon 6 eine Störung der mRNA-Prozessierung auslöste und dadurch zwei mutierte Proteinprodukte, CHMP2B<sup>Intron5</sup> und CHMP2B <sup>$\Delta$ 10</sup>, generierte. Bei CHMP2B<sup>Intron5</sup> fehlen 36 Aminosäuren des ursprünglichen, wildtypischen Proteins, zugleich kommt eine neue Aminosäure hinzu. CHMP2B <sup>$\Delta$ 10</sup> hingegen hat 29 neue Aminosäuren. Die Auswirkungen eines mutierten CHMP2B-Gens beschrieben Urwin *et al.* (2010). Sie analysierten das Gehirn und die Fibroblasten von FTD-Patienten. Die Autoren entdeckten stark vergrößerte Endosomen und einen spezifischen Defekt der Endosomen-Lysosomen-Fusion. Die Ursache dieser Beeinträchtigung lag in der verminderten Rekrutierung von Rab7 (Ypt7 in der Hefe) durch die konstitutive Bindung des mutierten CHMP2Bs an die MVBs.

Aber nicht nur in FTD-Patienten wurde eine Mutation in dieser ESCRT-Komponente festgestellt. Parkinson und Mitarbeiter (2006) entdeckten Veränderungen im CHMP2B-Gen bei zwei ALS-Fällen. Die Erkrankten waren negativ für andere Mutationen und wiesen p62- und Ubiquitin-positive Einschlüsse in Gehirn- und Rückenmarksgewebe auf.

Mehrere Wissenschaftler sahen einen direkten Zusammenhang zwischen einem gestörten endosomal-lysosomalen Weg, der Beeinträchtigung der Autophagie und der zellulären Anreicherung von Proteinen. Lee *et al.* (2007) analysierten die Folgen einer ESCRT-III-Fehlfunktion auf die Neuronen von murinem Gewebe und kultivierten Zellen. Die Depletion von mSnf7-2 bzw. die Expression von CHMP2B<sup>Intron5</sup> verursachte eine Akkumulation von Autophagosomen, eine Retraktion (Schrumpfung) der Dendriten und Neurodegeneration. Diese Resultate offenbarten einen direkten Zusammenhang der ESCRT-III-Komponenten mit der Autophagie und der Integrität der Dendriten bzw. dem Überleben der Neuronen.

Lee und Gao (2009) erweiterten ihre Ergebnisse. Sie kombinierten die genetisch induzierte ESCRT-III-Fehlfunktion mit einer gestörten Autophagie. Der Verlust von mSnf7-2 oder die Synthese von CHMP2B<sup>Intron5</sup> führte zum Zellverlust in kultivierten Rattenneuronen. Dieser

konnte durch die chemische bzw. genetische Herabregulation des autophagischen Prozesses vermindert werden. Des Weiteren führte die Synthese von CHMP2B<sup>Intron5</sup> zu einer Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen in den Endosomen und zu einer Akkumulation der Autophagosomen. Die Anzahl der autophagischen Vesikel, aber nicht die Proteinmenge wurde durch den Einsatz von Autophagie-reduzierenden Methoden erniedrigt. Dies belegt, dass die exzessive Ansammlung von Autophagosomen schädlich für die Zellen ist und sich nachteilig für das neuronale Überleben auswirken kann.

Auch im Zusammenhang mit der Eliminierung von TDP-43 wird ein beeinträchtigter MVB-Weg mit der Blockierung der Autophagie assoziiert. Filimonenko und Koautoren (2007) untersuchten die Auswirkungen von depletierten Komponenten der ESCRT-Maschinerie auf die Proteolyse in HeLa-Zellen. Hierfür reduzierten die Autoren mittels siRNA das Level der ESCRT-Untereinheiten Hrs, Tsg101, Vps22 oder Vps24 oder exprimierten mutiertes CHMP2B. Das Absenken der Proteinlevel bedingte die Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen in frühen Endosomen, MVBs sowie in der Nähe von Lysosomen. Diese Proteinaggregate waren positiv für p62 und Alfy (Autophagiemarker). Darüber hinaus führte die Abnahme des Tsg101- bzw. Vps24-Levels zur Hemmung des autophagischen Prozesses. So waren p62 und LC3 in den Zellen erhöht und die Fusion der Autophagosomen mit dem Lysosom reduziert. Ähnliches konnte bei der Synthese von mutiertem CHMP2B beobachtet werden. Auch hier reicherten sich Ubiquitin- und p62-positive Aggregate auf Grund einer blockierten Autophagie an. Die zytoplasmatischen Einschlüsse in den ESCRT-depletierten Zellen enthielten TDP-43. Ebenso wie TDP-43 wurde mutiertes Huntingtin über den endolysosomalen Weg eliminiert. Die Autoren schlossen daraus, dass funktionelle MVBs für den autophagosomalen Abbau von neurotoxischen Proteinen, wie TDP-43 und Huntingtin, benötigt werden. Allerdings schließen die Resultate die Möglichkeit nicht aus, dass der endosomal-vakuoläre Mechanismus selbst und unabhängig von der Autophagie an der Eliminierung von TDP-43 beteiligt ist.

Zu einem ähnlich Resultat gelangten Oshima und Mitarbeiter (2016). Sie studierten Mäuse, bei denen ausschließlich im Vorderhirn Hrs ausgeschaltet wurde und PC12-Zellen. Die Tiere waren kleiner, hatten ein niedrigeres Körpergewicht und eine reduzierte Lebenserwartung. Des Weiteren zeigten sie einen vermehrten Neuronenverlust im Hippocampus und einen höheren Anteil an Ubiquitin-positiven Einschlüssen. Zahlreiche, mit Neurodegeneration assoziierte, Proteine waren angereichert. Dazu gehörten  $\alpha$ -Synuclein (einzig im Hippocampus), Huntingtin und TDP-43. Die Aggregate enthielten p62. Ferner störte die Stilllegung von Hrs den späten Autophagieabschnitt. So war der Anteil von LC3-II zwar

erhöht, jedoch akkumulierte diese im Zytoplasma. Ursache hierfür war eine defekte Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen bzw. mit den MVBs. In den PC12 Zellen führte depletiertes Hrs zu einer Abnahme von lebenden sowie zu einer Zunahme von apoptotischen und nekrotischen Zellen, förderte den ER-Stress und die Anreicherung von  $\alpha$ -Synuclein und TDP-43. Die von den Autoren präferierte Kausalkette verknüpft die Störung des MVB-Wegs mit einer gehemmten Autophagie, einer Anreicherung von zellschädigenden Proteinaggregaten, Neurodegeneration und vorzeitigem Tod.

Dass TDP-43 über die Vakuole bzw. über das Lysosom abgebaut wird, konnte auf Grund der eigenen Resultate und verschiedener Veröffentlichungen belegt werden. Allerdings beschrieben die Autoren den autophagischen Prozess als den entscheidenden Eliminierungsmechanismus für TDP-43. Die pathologische Veränderung des endosomal-lysosomalen Systems sahen sie ausschließlich im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Autophagie. Dass TDP-43 ein direktes Substrat des endozytotischen Systems ist, zogen die Wissenschaftler nicht in Betracht. Jedoch legen die von mir vorgelegten Resultate diese Vermutung nahe. So konnten einerseits der Abbau von TDP-43, trotz der Inhibierung des autophagosomalen Wegs und andererseits eine Anreicherung des Proteins während der Deletion von verschiedenen ESCRT-Untereinheiten beobachtet werden. Dies führt zu dem Schluss, dass der endosomal-vakuoläre Prozess vorrangig für die Entfernung von TDP-43 verantwortlich ist und nicht das UPS oder die Autophagie (Abb. 50). Um die Beobachtungen in der Hefe zu verifizieren, sollten Studien in höheren Organismen durchgeführt werden. Ferner wären pharmazeutische Lösungen für die spezielle Forcierung des endosomal-vakuolären Prozesses hilfreich, um TDP-43 vermehrt abzubauen und somit die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen zu verhindern oder deren Fortschreiten zu verzögern. Trotz der eindeutigen Ergebnisse bezüglich der endosomal-vakuolären Eliminierung von TDP-43 stellt sich eine entscheidende Frage: wie gelangt zytoplasmatisch akkumuliertes TDP-43 unabhängig von der Autophagie in die MVBs? Lange Zeit wurde vermutet, dass der MVB-Weg ausnahmslos zum Transport von Plasmamembranbestandteilen sowie von biosynthetischen Komponenten aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk benötigt wird (siehe Abschnitt 1.4.3). Jedoch entdeckten Sahu und Mitarbeiter (2011), dass auch zytosolische Proteine in MVBs einsortiert werden können und bezeichneten den Vorgang als endosomale Mikroautophagie. Ihre Resultate beruhten auf der Verwendung dendritischer Zellen. Die Verfasser konnten beobachten, dass die Aufnahme der zytosolischen Proteine während der MVB-Biogenese, speziell bei der intraluminalen Vesikelbildung vorkommt, die ähnlich wie bei der vakuolären Mikroautophagie die Einstülpung der Membran voraussetzt. Der

proteolytische Weg war ATP-, aber nicht GTP-abhängig und unterschied sich von der CMA dahingehend, dass weder LAMP-2A noch eine Entfaltung der Proteine benötigt wurde. Darüber hinaus war der Prozess Autophagie-unabhängig, da ein reduziertes Atg7-Level keine Auswirkungen auf die Fähigkeit der MVBs hatte zytosolische Proteine aufzunehmen. Allerdings war er auf verschiedene ESCRT-Untereinheiten angewiesen. Die MVBs konnten Proteine unspezifisch *en masse* oder individuell in Abhängigkeit vom KFERQ-Motiv des Zielproteins vereinnahmen. Die Sequenzerkennung erfolgte mit Hilfe des Chaperons Hsc70, welches über Phosphatidylserin (PS) an die MVB-Membran binden kann.

Aber nicht nur im Säugersystem war die endosomale Mikroautophagie zu beobachten, sondern auch in der Hefe. Liu und Mitarbeiter (2015) erforschten die Spaltheife *S. pombe* und fanden heraus, dass der selektive Autophagierezeptor Nbr1 mit den zytosolischen Hydrolasen Lap2 und Ape2 zu einem Komplex assoziiert und deren vakuolären Abbau über die MVBs initiiert. Der Mechanismus war unabhängig von der Autophagiemaschinerie, benötigte jedoch die ESCRT-Komplexe und eine Proteinmarkierung mittels Ubiquitin. Liu *et al.* (2015) konnten nachweisen, dass in der Hefe die ESCRT-Maschinerie nicht nur für den Transport von Membranproteinen benötigt wird, sondern auch an der vakuolären Eliminierung von löslichen Proteinen beteiligt ist.

Die endosomale Mikroautophagie entfernt neben zytosolischen Proteinen ebenso komplette Organellen. Hammerling *et al.* (2017) beschrieben, dass geschädigte Mitochondrien in MEF-Zellen durch die E3-Ligase Parkin ubiquitiniert und für die frühen Endosomen als Ziel markiert werden können. Die Aufnahme der Organellen war ESCRT-abhängig. Die frühen Endosomen reiften anschließend zu MVBs, welche die Mitochondrien für deren Abbau ins Lysosom beförderten. War der Prozess durch mutiertes Rab5 oder depletiertes Rab7 gestört führte dies zu einer Anreicherung von gestressten Mitochondrien und zu vermehrtem Zelltod. Die endosomale Mikroautophagie ist somit nicht nur ein Qualitätskontrollmechanismus für Proteine, sondern auch für Mitochondrien.

Die vorgestellten Veröffentlichungen beweisen, dass die Aufnahme und Entfernung von zytosolischen Proteinen mit Hilfe der MVBs möglich ist. Demzufolge ist es nicht unwahrscheinlich, dass TDP-43 über die endosomale Mikroautophagie, unabhängig von der Autophagie, entfernt wird (Abb. 50). Jedoch muss das Protein vermutlich, ähnlich wie von Hammerling *et al.* (2017) für die Mitochondrien beschrieben, gezielt markiert werden. Dies könnte mittels einer Ubiquitinierung durch die E3-Ligase Rsp5 erfolgen. Gute Ansätze für diese Theorie wurden mit Hilfe dieser Arbeit gefunden.

#### 5.2.4 Die Ubiquitinligase Rsp5 ist an der Eliminierung von TDP-43 beteiligt

Der Beitrag von Rsp5 am TDP-43-Abbau ergab sich aus fluoreszenzmikroskopischen, biochemischen sowie wachstumsbedingten Beobachtungen. Zunächst konnte eine starke Kollokalisierung zwischen TDP-43-DsRed und GFP-Rsp5 von ca. 42% im Wildtyp festgestellt werden (Abb. 43). Die in ihrer Funktion modifizierten Rsp5-Varianten A401E und P343S zeigten Unterschiede in Bezug auf ihr Wachstum bei der Expression von TDP-43, der Anzahl und des Levels an TDP-43. Beim A401E-Stamm, der eine reduzierte Rsp5-Aktivität besitzt (Wijayanti *et al.* 2015), wurde ein vermindertes Wachstum während der Synthese von TDP-43 festgestellt (Abb. 44). Ferner besaß der Stamm eine erhöhte Anzahl an TDP-43-positiven Aggregaten und ein erhöhtes TDP-43-Level (Abb. 45 und 46). Im Gegensatz dazu hatte die P343S-Variante, die die Ubiquitinierung von Proteinen steigert (Wijayanti *et al.* 2015), ein ähnliches Wuchsverhalten wie der Wildtyp bei der TDP-43-Expression, signifikant weniger TDP-43-Einschlüsse und ein niedrigeres TDP-43-Proteinlevel (zum Wildtyp nicht signifikant) (Abb. 44, 45 und 46). Aus diesen Resultaten lässt sich schließen, dass die Aktivität der Ubiquitinligase Rsp5 die TDP-43-Anreicherung in der Zelle moduliert und das neurotoxische Protein möglicherweise zum Entfernen markiert (Abb. 50).

Die wichtigste Funktion von Rsp5 ist die Ubiquitinierung und damit die Markierung von verschiedenen Proteinen, wie Cps1, Gap1, Sna3 oder Phm5, für die Proteolyse oder den Transport (Morvan *et al.* 2004, Wang *et al.* 2011).

Das genetisch modifizierte Membranprotein Wsc1\* wird ebenso über Rsp5 für den endosomal-vakuolären Abbau gekennzeichnet (Wang *et al.* 2011). Die Wissenschaftler veränderten alle Lysinreste des Proteins zu Arginin, wodurch eine Ubiquitinierung mittels Rsp5 nicht mehr möglich war. In einem zweiten Ansatz wurde *rsp5-1* verwendet, eine inaktive Mutante, die Wsc1\* nicht modifizieren konnte. In beiden Fällen erfolgte keine Einsortierung des fehlgefalteten Proteins in die MVBs. Dadurch entstanden toxische Spaltprodukte.

Des Weiteren konnten Zhao und Mitarbeiter (2013) beweisen, dass Rsp5 in Verbindung mit dem Adapterprotein Arrestin (ART) ein Qualitätskontrollsystem für Plasmamembranproteine bildet. Sie zeigten in Hefe, dass ART-Rsp5 fehlgefaltete oder geschädigte Proteine, welche durch thermalen Stress induziert wurden, abbaut und dadurch die Akkumulation von toxischen Aggregaten in der Zelloberfläche unterbindet. Die Ubiquitinligase Rsp5 schützt die Hefezellen vor proteotoxischem Stress, indem es Plasmamembranproteine zügig für den Abbau kennzeichnete.

Allerdings werden nicht nur fehlgefaltete Proteine durch die E3-Ligase markiert, sondern auch das neurotoxische Protein  $\alpha$ -Synuclein. Tofaris *et al.* (2011) bewiesen, dass die Einsortierung des Proteins in die MVBs Nedd4-abhängig (humanes Homolog zu Rsp5) ist. Das E3-Enzym modifizierte  $\alpha$ -Synuclein mit einer K63-verbundenen Ubiquitinkette. Eine Überexpression von Nedd4 verstärkte die Ubiquitinierung des neurotoxischen Proteins und förderte dessen lysosomale Eliminierung über die MVBs. Die Verwendung einer inaktiven Rsp5-Mutante in der Hefe verminderte die Entfernung von  $\alpha$ -Synuclein, beschleunigte die Bildung von Einschlüssen und führte zu einer erhöhten  $\alpha$ -Synuclein-bedingten Toxizität. Die Verfasser schlussfolgerten daraus, dass Nedd4  $\alpha$ -Synuclein durch dessen Ubiquitinierung für den endosomal-lysosomalen Weg markiert und dass eine Reduktion des neurotoxischen Proteins gegen die Parkinson-Erkrankung und andere  $\alpha$ -Synucleinopathien schützen könnte.

Die Vorstellung von Tofaris *et al.*, dass Rsp5  $\alpha$ -Synuclein für den endozytotischen Abbau kennzeichnet, konnten Tardiff und Koautoren (2013) untermauern. Sie untersuchten die E3-Ligase im Zusammenhang mit N-aryl Benzimidazol (NAB) in Hefe, *C. elegans* und Neuronen-angereicherten Kulturen. Ihre Resultate zeigten, dass NAB den Rsp5-abhängigen endosomalen Transport von Plasmamembran-komponenten und biosynthetischen Proteinen vom Golgi-Apparat unterstützt. Des Weiteren verminderten die Ubiquitinligase und die chemische Substanz die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in den Hefezellen und verbesserten das Wachstum bei  $\alpha$ -Synuclein exprimierenden Stämmen. Die Resultate bewiesen: Rsp5 ist in der Lage  $\alpha$ -Synuclein über die MVBs zu eliminieren.

Genauere Einblicke in die Wirkungsweise von Rsp5 bei der Ubiquitinierung von  $\alpha$ -Synuclein gaben Wijayanti und Mitarbeiter (2015). Die Wissenschaftler kreierte verschiedene Rsp5-Varianten und beobachteten die Auswirkungen auf die  $\alpha$ -Synuclein verursachte Toxizität. Es stellte sich heraus, dass es sich bei P343S um eine hyperaktive Rsp5-Mutante handelte, die die  $\alpha$ -Synuclein Toxizität minderte und dessen Eliminierung durch verstärkte Ubiquitinierung förderte. Die A401E-Variante von Rsp5 hingegen war gegenüber  $\alpha$ -Synuclein empfindlicher, möglicherweise war dies auf eine Hemmung der Ubiquitinierung des toxischen Proteins zurückzuführen. Die Studie von Wijayanti *et al.* (2015) legt nahe, dass die Ubiquitinierung von  $\alpha$ -Synuclein durch Rsp5 ein essentieller Mechanismus für dessen Abbau darstellt. Hierbei bestimmt die Art der Ubiquitinierung und die Topologie der Kette das Schicksal des markierten Proteins (siehe Abschnitt 1.4.1).

Die Rsp5-Ligase bevorzugt die Bildung von K63-verknüpften Ubiquitinketten. Dies konnten u. a. Kee *et al.* (2005), Stawiecka-Mirota *et al.* (2007) und Sugeno *et al.* (2014) feststellen. Jedoch ist Rsp5 auch in der Lage K48-verbundene Ketten zu synthetisieren. Nach einem

Hitzeschock werden zytosolische, fehlgefaltete Proteine in der Hefezelle direkt von Rsp5 oder indirekt, über einen Adapter, ubiquitiniert (Fang *et al.* 2014). Die Deubiquitinasen Ubp2 und Ubp3 verhindern hierbei die Assemblierung von K63-verknüpften Ubiquitinketten durch Rsp5 und fördern stattdessen die K48-Modifikation (Fang *et al.* 2016).

Die vorgestellten Publikationen beweisen: Rsp5 unterstützt unter bestimmten Voraussetzungen die Bildung von K48-zusammengefügten Ubiquitinketten. Allerdings ist es vor allem für die Synthese von K63-verknüpften Ketten zuständig. Die so markierten Proteine werden anschließend über den endosomal-vakuolären Weg oder die Autophagie abgebaut.

Interessanterweise erfolgt die Modifikation von TDP-43 überwiegend mit K48- und K63-verbundenem Ubiquitin. Die Hyperubiquitinierung des Proteins wurde bereits 2006 bei dessen Entdeckung als Hauptkomponente in pathologischen Einschlüssen bei ALS- und FTD-Patienten beschrieben (Arai *et al.* 2006, Neumann *et al.* 2006). Allerdings zeigten erst Seyfried und Mitarbeiter (2010), dass TDP-43 mit K48- und K63-verkettetem Ubiquitin markiert wird. Die Verfasser untersuchten das neurotoxische Protein in einer humanen Zelllinie und in primären Mausneuronen. Besonders das Volllängenprotein kennzeichnete sich durch K63-verknüpfte Ubiquitinketten aus. Die Modifikation des ebenso analysierten N-terminalen TDP-43-Fragments beinhaltete K11-, K48- und K63-verbundenes Ubiquitin. Neben Seyfried *et al.* bestätigten Hebron *et al.* (2013) sowie Scotter *et al.* (2014), dass TDP-43 primär über K48- und K63-verkettetes Ubiquitin modifiziert wird.

Auf Grundlage der veröffentlichten Datenlage und der eigenen Resultate ist es reizvoll zu spekulieren, dass TDP-43 durch Rsp5 ubiquitiniert und dadurch primär für den Abbau über die endosomale Mikroautophagie oder alternativ über die Makroautophagie gekennzeichnet wird. Dafür spricht, dass TDP-43 sowohl mit Rsp5, mit Atg8 als auch mit dem MVB-Substrat Sna3 kolokalisiert. Ferner konnten in Abhängigkeit der Rsp5-Ubiquitinierungsaktivität ein variables Zellwachstum bei der Expression von TDP-43, eine abweichende Aggregatanzahl sowie ein verändertes Proteinlevel festgestellt werden. Ebenso führte die Deletion von unterschiedlichen ESCRT-Komponenten zur Anreicherung von TDP-43 und zu einem verminderten Wuchs der Stämme während der Expression des neurotoxischen Proteins gegenüber dem Wildtyp.

Die posttranslationale Modifikation von TDP-43 durch Rsp5 ist auch deswegen naheliegend, da beide Proteine einen gemeinsamen Nenner besitzen: die K63-verbundenen Ubiquitinketten. Die E3-Ligase bevorzugt diese Assemblierung, während TDP-43 vermehrt solche aufweist. Allerdings benötigt TDP-43 möglicherweise ein Adapterprotein, um von Rsp5 ubiquitiniert werden zu können, ähnlich wie die Plasmamembranproteine Mup1, Can1

oder Fur4 sowie fehlgefaltete zytosolische Proteine, die zunächst durch die  $\alpha$ -Arrestin bzw. Hsp40 gebunden und dann mittels Rsp5 ubiquitiniert werden (Lin *et al.* 2008, Fang *et al.* 2014, Prosser *et al.* 2015, Guiney *et al.* 2016)

Die Resultate der vorliegenden Arbeit lieferten gute Ansätze für eine Rsp5-abhängige, durch die endosomale Mikroautophagie bzw. Makroautophagie durchgeführte Eliminierung von TDP-43 aus der Zelle. Die gegenwärtige Datenlage sollte mittels weiteren Studien verifiziert und erweitert werden, da dadurch pharmakologische oder genetische Strategien zum Abbau von zytoplasmatischen TDP-43-Aggregaten entwickelt und ein neuer Ansatz zur Therapie von TDP-43-Proteinopathien gefunden werden könnte.

Die eigenen Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass TDP-43 über die Vakuole eliminiert wird. Um dies zu erreichen muss das TDP-43-enhaltende Vesikel (MVB oder Autophagosom) mit dem vakuolären Kompartiment fusionieren können. Hierzu wird die Fusionsmaschinerie benötigt.

### 5.2.5 Bedeutung der Vakuole und der Vakuolenfusion beim TDP-43-Abbauprozess

Der Umstand, dass TDP-43 über die Vakuole eliminiert wird, konnte unter Zuhilfenahme des Tüpfeltestscreens, der Fluoreszenzmikroskopie und dem Western Blot erhärtet werden.

Mittels des Wachstumstests wurde eine Reduktion des Wachstums bei acht von 10 Deletionsstämmen für die Vakuolenfusion gegenüber dem Wildtyp während der Expression von TDP-43 festgestellt (Abb. 14). Nur zwei Mutanten besaßen einen verbesserten Wuchs. Einer davon war  $\Delta ybt1$ . Im Gegensatz zu den anderen Stämmen fördert die Deletion von *YBT1* die Vakuolenfusion (siehe Abschnitt 4.1.5). Analog dazu wurde die im  $\Delta vam3$ -Stamm beobachtete erhöhte Toxizität bei der Synthese von TDP-43 durch das Einbringen von exogenem Vam3 teilweise gerettet (Abb. 30). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Vakuolenfusion die Eliminierung von TDP-43 positiv unterstützt.

Neben der Fusionsmaschinerie üben die vakuoläre Funktion und die Vakuolenmorphologie Einfluss auf die TDP-43verursachte Toxizität aus. So besitzt der  $\Delta pep4$ -Stamm an beiden analysierten Tagen im Tüpfeltestscreen einen negativen Wuchs (Tag 3: -0,448; Tag 6: -0,300) (siehe Anhang Abb. VIII). Auf Grund der Rolle des Proteins als vakuoläre Proteinase und als Initiator für die Reifung anderer vakuolärer Hydrolasen schränkt die Gendeletion die Vakuolenaktivität ein (Ammerer *et al.* 1986, Woolford *et al.* 1986). Es ist daher wahrscheinlich, dass die im Screen beobachtete Wachstumsreduktion auf eine beeinträchtigte vakuoläre Entfernung von TDP-43 zurückzuführen ist, die jedoch keine Auswirkungen auf

die Akkumulation von sichtbaren TDP-43-Aggregaten hatte (Abb. 34 und Anhang Abb. XI). Abgesehen von der Funktionalität ist die Vakuolenmorphologie ein entscheidendes Kriterium für das Toxizitätsvermögen von TDP-43. Die pharmakologisch induzierte vakuoläre Fragmentierung durch Propranolol forciert die TDP-43-bedingte Toxizität und mindert das Wachstum der Hefe (Abb. 19, 20 und 21). Die Veränderung des vakuolären Erscheinungsbilds potenziert die TDP-43-Zytotoxizität.

Unabhängig von den Tüpfelteststudien konnte bei der Fusionsmutante  $\Delta vam3$  ein Anstieg der TDP-43-Aggregate und des Proteinlevels in Hunger- bzw. in Galaktose-haltigem Medium festgestellt werden (Abb. 32, 33, 34 und 40 sowie Anhang Abb. XI und XII).

Die Kombination aus einer gestörten Fusion und einer reduzierten Vakuolenaktivität, die durch den Einsatz der Doppelmutanten  $\Delta vam3\Delta pep4$  bzw.  $\Delta vam\Delta atg15$  initiiert wurde, war für die Zelle äußerst schädlich (Abb. 31). Allerdings waren die erhöhte Wachstumsreduktion, die Anzahl und das Level an TDP-43 vergleichbar zum  $\Delta vam3$ -Stamm (Abb. 31, 34, 35 und Anhang Abb. XI). Die Einschränkung beider zellulärer Mechanismen hatte keine gesteigerte Wirkung auf die TDP-43-verursachte Zytotoxizität. Scheinbar ist die Akkumulation von TDP-43 im Zytoplasma der primäre Auslöser für dessen toxische Wirkung und nicht die vermehrte Einlagerung des Proteins in die Vakuole.

Die gleichzeitige Hemmung der vakuolären Fusion und der Autophagie beim  $\Delta vam3\Delta atg1$  war ähnlich zellschädigend wie bei  $\Delta vam3$  (Abb. 31). Die Anzahl der TDP-43-Punkte sowie der Gehalt des Proteins waren im Doppeldeletionsstamm annähernd gleich zur Fusionsmutante (Abb. 31, 34, 35 und Anhang Abb. XI). Übereinstimmend mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit zeigen diese Beobachtungen, dass der autophagische Prozess vorrangig nicht am Abbau von TDP-43 beteiligt ist.

Da TDP-43 mutmaßlich vakuolär eliminiert wird, ist eine direkte Interaktion von TDP-43 mit der Fusionskomponente Vam3 denkbar. Allerdings konnte weder im Wildtyp noch im  $\Delta vam3$ -Stamm eine unmittelbare Interaktion der zwei Proteine fluoreszenzmikroskopisch festgestellt werden (Abb. 36). Das vorliegende Beispiel lässt vermuten, dass TDP-43 nicht mit der Vakuolenmaschinerie in Verbindung steht. Jedoch sollten weitere Untersuchungen mit anderen Fusionskomponenten unternommen werden, da annähernd alle Versuche darauf hinweisen, dass die Vakuole das zentrale Organell für die Eliminierung von TDP-43 darstellt. Dementsprechend ist die Fusionsmaschinerie ein entscheidender Mechanismus zur Modulierung der TDP-43-bedingten Toxizität.

Generell ist die Vakuole bzw. das Lysosom für die Beseitigung von neurotoxischen Proteinen essentiell. Es existieren zahlreiche Hinweise, dass eine lysosomale Dysfunktion im Gehirn

eine wichtige Rolle bei der pathogenen Ablagerung von Proteinen spielt (Zhang *et al.* 2009). So konnten z. B. viele wissenschaftliche Studien eine enge Beziehung zwischen einer lysosomalen Fehlfunktion und der Morphologie der Alzheimer-Krankheit nachweisen. Die funktionelle Veränderung des Lysosoms könnte möglicherweise die erste histopathologische Abweichung in der neurodegenerativen Erkrankung darstellen. Ferner enthalten amyloide Plaques viele aktive lysosomale Hydrolasen, was darauf hindeutet, dass sie vielleicht aus rupturierten Lysosomen hervorgegangen sind (Zhang *et al.* 2009). Darüber hinaus konnten Mueller-Steiner und Koautoren (2006) nachweisen, dass die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B  $A\beta$ -Peptide, besonders die aggregationsanfällige  $A\beta_{1-42}$ -Spezies, durch proteolytische Spaltung abbaut. Ohne dieses Enzym stieg das  $A\beta_{1-42}$ -Level und verschlimmerte die Plaqueablagerung in hAPP-exprimierenden Mäusen (Mueller-Steiner *et al.* 2006). Diese Studie zeigt, dass die lysosomale Enzymaktivität bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen von großer Bedeutung ist.

Die These konnte durch die Arbeit von Sevlever und Mitarbeitern (2008) untermauert werden. Die Wissenschaftler zeigten im Zusammenhang mit  $\alpha$ -Synuclein, dass die lysosomale enzymatische Funktionalität unerlässlich für die Eliminierung des Proteins ist. Generell gilt die Fehlfunktion des Lysosoms, verbunden mit der Anreicherung von  $\alpha$ -Synuclein, als prädisponierender Faktor für die Parkinson-Erkrankung (Fraldi *et al.* 2016). Sevlever *et al.* (2008) stellten in *in vitro* Experimenten fest, dass das lysosomale Protein Cathepsin D effizient  $\alpha$ -Synuclein entfernt und dass eine begrenzte Proteolyse die Bildung von C-terminal gekürzten Formen unterstützt. Durch die Reduzierung des Enzymlevels in Zellen, welche  $\alpha$ -Synuclein überexprimierten, stieg das Level des neurotoxischen Proteins. Die vollständige Hemmung von Cathepsin D durch Pepstatin A verhindert den Abbau von  $\alpha$ -Synuclein in aufgereinigten Lysosomen vollständig. Das lysosomale Enzym ist somit die Hauptkomponente für die Eliminierung von  $\alpha$ -Synuclein. Eine Störung der Lysosomenfunktion begünstigt die Anreicherung von Proteinen und stellt eine potenzielle Ursache für Neurodegeneration dar.

Einen anderen Aspekt im Zusammenhang mit der Degeneration von Nervenzellen bilden die sogenannten lysosomalen Speicherkrankheiten (LSK). Sie sind das Ergebnis einer Genmutation, welche einen spezifischen Defekt in einem lysosomalen Enzym bedingt (Mehta *et al.* 2006, Plotegher und Duchon 2017). Auf Grund der verringerten oder fehlenden Enzymaktivität kommt es zur lysosomalen Akkumulation von überflüssigen Makromolekülen wie z. B. von Glykolipiden (Mehta *et al.* 2006).

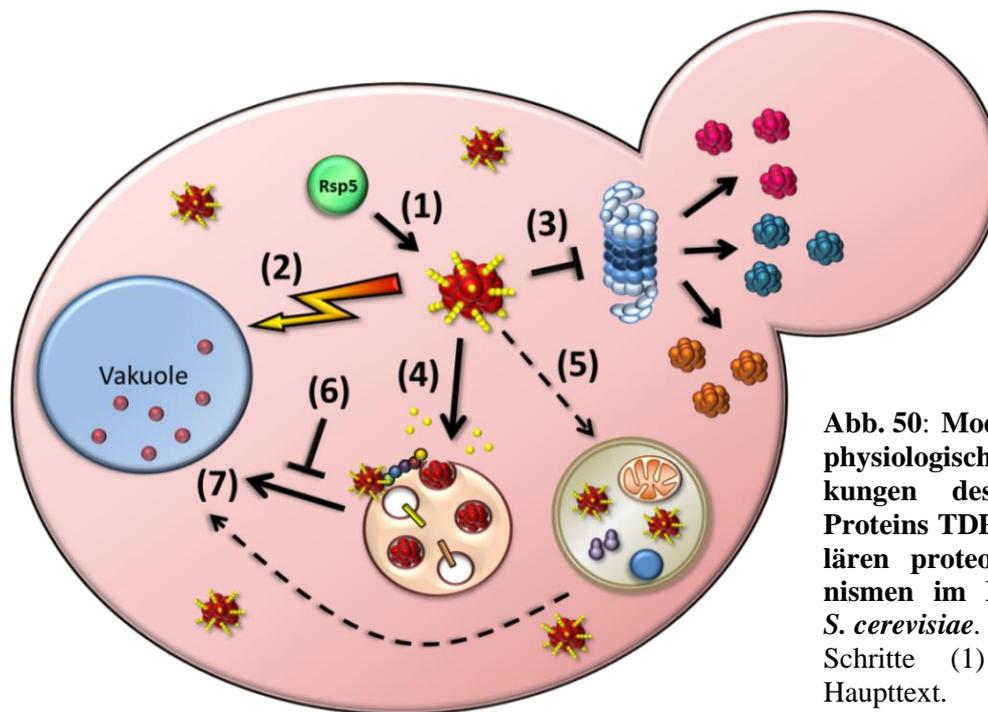
Unabhängig von Cathepsin D führte eine Mutation im Gen, welches für die lysosomale  $\beta$ -Glucocerebrosidase (GBA) codiert, zur Anreicherung von  $\alpha$ -Synuclein in der Zelle (Mazzulli *et al.* 2011). Die genetische Veränderung in GBA reduzierte das Enzymlevel im Organell und führte zur einer Anhäufung von Glucosylceramid (GBA-Substrat). Das akkumulierte Cerebrosid beschleunigte und stabilisierte lösliches, oligomeres  $\alpha$ -Synuclein, welches sich anschließend in amyloide Fibrillen umwandelte (Mazzulli *et al.* 2011). Gleichzeitig störte das akkumulierte  $\alpha$ -Synuclein den Transport von neusynthetisiertem GBA ins Lysosom, wodurch sich die pathogene Situation weiterhin verschlechterte. Die Dysfunktion des Lysosoms und die Anreicherung von  $\alpha$ -Synuclein begünstigen einen bidirektionalen Teufelskreis (Mazzulli *et al.* 2011).

Anhand dieser Beispiele konnte gezeigt werden, dass die Vakuole bzw. das Lysosom eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung neurotoxischer Proteinen spielt und dass eine lysosomale Fehlfunktion zum Ausbruch verschiedener Krankheiten beiträgt. Es ist zu vermuten, dass analoge Mechanismen die Krankheitsentstehung fördern. So könnte eine verminderte Lysosomenfunktion die Proteinhomöostase in den dafür anfälligen Synapsen stören (siehe Abschnitt 1.4.4) und neurodegenerative Prozesse beschleunigen (Fraldi *et al.* 2016).

Bis dato ist ein pathologischer Zusammenhang zwischen einer verringerten lysosomalen Aktivität und einer Anreicherung von zytoplasmatischen TDP-43 unbekannt. Einzig Armakola und Mitarbeiter (2012) konnten in einem großen Hefescreen nachweisen, dass  $\Delta nhx1$  die TDP-43-assoziierte Toxizität in den Zellen steigert. Der Ionenaustauscher ist in der Vakuole und im MVB lokalisiert und unterstützt die vakuoläre Fusion (Nass *et al.* 1997, Qiu und Fratti 2010). Fehlt Nhx1 führt dies in der Hefezelle zu einer vakuolären Fragmentierung und zu einer reduzierten Fusion. Der Carrier reguliert den initialen Schritt der Vakuolenfusion (Qiu und Fratti 2010). Armakola und Koautoren konnten mittels ihrer Studie zeigen, dass neben anderen Prozessen auch die vakuoläre Fusion das Toxizitätsvermögen von TDP-43 beeinflusst. Abgesehen von dieser Publikation existieren keine veröffentlichten Daten, die speziell die Auswirkungen der Vakuole oder der Vakuolenfusion auf die TDP-43-bedingte Toxizität analysieren. Jedoch ist eine gründliche Untersuchung des Organells und des dazugehörigen Mechanismus im Zusammenhang mit TDP-43 überaus sinnvoll. Durch die spezifische Forcierung der vakuolären Fusion bzw. Aktivität könnte akkumuliertes toxisches TDP-43 zügiger aus der Zelle beseitigt und die Bildung neurodegenerativer Erkrankungen verhindert, verzögert oder der Krankheitsverlauf verlangsamt werden.

### 5.3 TDP-43 und die zellulären proteolytischen Mechanismen – ein pathologischer Teufelskreis

Die Hefe ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, ein wirkungsvolles Instrument zur Erforschung der TDP-43-Proteinopathien. Mit Hilfe des Organismus war es möglich folgende Erkenntnisse zu gewinnen (Abb. 50): (1) TDP-43 kolokalisiert zu ca. 42% mit der E3-Ligase Rsp5.



**Abb. 50: Modell zu den pathophysiologischen Wechselwirkungen des neurotoxischen Proteins TDP-43 mit den zellulären proteolytischen Mechanismen im Modellorganismus *S. cerevisiae*.** Erläuterung der Schritte (1) bis (7) siehe Haupttext.

Eventuell modifiziert Rsp5 das neurotoxische Protein mit einer K63-verknüpften Ubiquitinketten und markiert es dadurch für den endosomal-vakuolären Abbau oder für die Autophagie. (2) TDP-43 verändert die vakuoläre Morphologie und löst damit möglicherweise komplexe pathologische Zellveränderungen hervor (z. B. Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen oder defekten Organellen). (3) Die Hemmung des UPS verstärkt die TDP-43-verursachte Zytotoxizität. Das neurotoxische Protein ist jedoch kein Substrat des proteasomalen Mechanismus. Die gesteigerte Toxizität könnte auf die Anreicherung von Proteinaggregaten, hervorgerufen durch eine TDP-43-bedingte Störung des UPS, zurückgeführt werden. (4) Die Entfernung von TDP-43 aus der Zelle erfolgt vorrangig über den endosomal-vakuolären Prozess, möglicherweise über die endosomale Mikroautophagie. (5) TDP-43 fördert den terminalen Abschnitt der Autophagie. Ferner dient der autophagosomale Weg als kompensatorisches System zur Entfernung des neurotoxischen Proteins. (6) TDP-43 hemmt den endosomal-vakuolären Verlauf und damit seine eigene

Eliminierung. (7) Vakuolenfusion, vakuoläre Morphologie und Funktionalität sind essentiell für den Abbau von TDP-43.

## 5.4 TDP-43-Expression führt zur Anreicherung von Hitzeschockproteinen

Die Veränderung der Synthese bestimmter Proteine, wie etwa Atg7 oder HDAC6, während der Depletion von TDP-43 war Gegenstand vorangegangener Studien (siehe Abschnitt 5.1.1). In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen der TDP-43-Überexpression auf die zelluläre Proteinzusammensetzung (Proteom) untersucht werden. Die hierzu verwendete quantitative Proteomanalyse (SILAC) ergab, dass in TDP-43-exprimierenden Kulturen 18 Proteine signifikant angereichert und 33 Proteine signifikant abgereichert wurden (Abb. 48). Die abgereicherten Proteine waren mehrheitlich Bestandteile der mitochondrialen  $F_1F_0$ -Synthase, genauer des sogenannten enzymatischen „Stiels“ (*stator*) (Abb. 49). Die Komponente stabilisiert die  $F_1$ -Untereinheit und gewährleistet dessen Drehung. Der Stiel ist nicht an der katalytischen Funktion der  $F_1F_0$ -Synthase beteiligt (Xu *et al.* 2015). Zwei der insgesamt 18 angereicherten Proteine waren die Hitzeschockproteine Hsp31 und Ssa4 (Abb. 49).

Die Mehrheit der Hitzeschockproteine (HSP) sind molekulare Chaperone, die bei verschiedenen Formen von Stress (thermal, oxidativ, chemisch) induziert werden. Die Proteine sind essentielle Komponenten der Proteinqualitätskontrolle (Ciechanover und Kwon 2017). Sie assistieren dem UPS und der Autophagie, indem sie und ihre Regulatoren Proteine *de novo* falten bzw. neu strukturieren (Hartl *et al.* 2011). Irreversibel fehlgefaltete oder aggregierte Proteine werden über die proteolytischen Wege eliminiert. HSPs werden in Abhängigkeit von ihrer Größe in Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 (DnaJ) und kleine HSPs unterteilt (Ciechanover und Kwon 2017). In der Hefe kann das Chaperon Hsp104 in Zusammenarbeit mit anderen HSPs und unter Verbrauch von ATP aggregierte Proteine unmittelbar auflösen oder neu falten (Ciechanover und Kwon 2017).

Im Zusammenhang mit neurotoxischen Proteinen wie Tau, mutiertem Huntingtin oder TDP-43 spielen die HSPs eine kritische Rolle (Zhang *et al.* 2010). Bei den ersten beiden Proteinen fördert die Bindung der Chaperone deren proteasomalen Abbau (Zhang *et al.* 2010). In Bezug auf TDP-43 analysierten Zhang und Koautoren (2010) die Bedeutung der Chaperone Hsp90 und Hsp70 auf die Eliminierung des neurotoxischen Proteins in M17D3-Zellen. Sie depletierten die Proteine durch den Einsatz von siRNA, welches zur

Akkumulation von phosphoryliertem sowie C-terminalem TDP-43 führte. Ferner konnten die Verfasser eine direkte Interaktion zwischen Hsp90, Hsp70 und dem C-terminalen Fragment TDP<sub>220-414</sub> nachweisen. Die Autoren schlossen daraus, dass die Chaperone bevorzugt phosphoryliertes, C-Terminal-gekürztes TDP-43 beim Abbau unterstützen.

Dass die HSPs das Aggregationsverhalten von TDP-43 in engem Umfang bestimmen, konnten Udan-Johns *et al.* (2013) bestätigen. Sie verwendeten mehrere Zelllinien und induzierten durch einen Hitzeschock die Bildung von nukleären TDP-43-Aggregaten. Die Anreicherung verschiedener Formen des neurotoxischen Proteins (wildtypisches und 25 kDa Fragment) wurde durch die Überexpression von Hsp40 bzw. Hsp70 gesenkt. Eine Mutation im Hsp40 Protein DNAJB6 hob den positiven Effekt auf. Ebenso wie bei Zhang *et al.* (2010) konnte ein unmittelbares Zusammenspiel zwischen TDP-43, Hsp40 und Hsp70 festgestellt werden. Nur direkt nach dem Hitzeschock schienen sich die Chaperone vermehrt vom aggregierten TDP-43 zu lösen, um möglicherweise hitzegeschädigte Proteine neu zu falten.

Die protektive Wirkung der HSP auf TDP-43 wurde von Jackrel und Shorter (2014) um Hsp104 erweitert. Die Autoren kreierte potenzierte Hsp104-Varianten und untersuchten die Auswirkungen während der Expression von wildtypischem und mutiertem TDP-43. Sowohl die TDP-43-bedingte Zytotoxizität als auch die zytoplasmatische Akkumulation war durch die Synthese von aktiverem Hsp104 reduziert.

Die Chaperone werden durch den Transkriptionsfaktor HSF1 reguliert. Die Relation von HSF1 und TDP-43 wurde von Chen *et al.* (2016) erforscht. Die Expression einer besonders aktiven Form des Transkriptionsfaktors in Zelllinien und primären Neuronen senkte das Level an unlöslichem TDP-43 in der Zelle. Ferner reduzierte es den Phosphorylierungsgrad des Proteins, dessen zytoplasmatische Aggregation und die TDP-43-verursachte Toxizität. Das Co-Chaperon DNAJB2a war zusammen mit Hsp70 für die Entfaltung des aggregierten TDP-43 verantwortlich. Das Level von Hsp70, Hsp40 und HSF1 war in ALS-Mausmodellen und in Patienten mit sALS nachweislich reduziert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Hitzeschockantwort über HSF1 und DNAJB2a bei der ALS gestört ist und dass die Anreicherung von TDP-43 auf Grund der mangelnden Neufaltung des Proteins gefördert wird.

Die Beziehung zwischen den Hitzeschockproteinen und TDP-43 ist jedoch keinesfalls einseitig. Die Synthese des neurotoxischen Proteins hat ebenso Auswirkungen auf den Gehalt der Chaperone. So stellten Zhang und Mitarbeiter (2010) fest, dass die Expression von TDP<sub>220-414</sub> das Hsp70-Level steigerte. Ferner konnten Chang *et al.* (2013) nachweisen, dass

Hsp90, Hsp70 und Hsp32 bei der Expression von Vollängen-TDP-43 heraufreguliert und Hsp27 herabreguliert wurden.

Diese Resultate decken sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. Es konnte eine Anreicherung der Hitzeschockproteine Hsp31 und Ssa4 während der Expression von TDP-43 festgestellt werden. Hsp31 wird in der Hefe unter oxidativen Stressbedingungen oder in der post-diauxischen Phase induziert (Skoneczna *et al.* 2007). Es spielt eine wichtige Rolle beim Überleben der Zelle im stationären Zustand und schützt diese vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Skoneczna *et al.* 2007, Miller-Fleming *et al.* 2014). Hsp31 ist ein Mitglied der DJ-1 Superfamilie (Skoneczna *et al.* 2007). Das humane DJ-1 ist ein aus 189 Aminosäuren zusammengesetztes, allgegenwärtig exprimiertes Protein mit zahlreichen Funktionen (Klein und Westenberger 2012). Neben seiner antioxidativen Funktion dient als transkriptioneller Regulator, als molekulares Chaperon oder im Proteinabbau (Raninga *et al.* 2014, Hijioka *et al.* 2017). Auf Grund seiner Aktivität als Chaperon und in den proteolytischen Systemen verhindert es die Aggregation von neurotoxischen Proteinen und den Ausbruch von Krankheiten. So konnte gezeigt werden, dass Aggregate mit  $\alpha$ -Synuclein oder mutiertem Huntingtin durch DJ-1 verhindert bzw. aufgelöst werden (Hijioka *et al.* 2017). Darüber hinaus agiert DJ-1 in einem E3-Ligasekomplex und unterstützt die Proteolyse über das UPS und die Autophagie (Sala *et al.* 2016, Hijioka *et al.* 2017). Speziell an der Eliminierung von  $\alpha$ -Synuclein scheint das HSP beteiligt zu sein (Hijioka *et al.* 2017). Mutationen in DJ-1 können zu einer früh einsetzender Parkinson-Erkrankung oder Krebs beitragen (Raninga *et al.* 2014, Klein und Westenberger 2012). Hierbei bindet das mutierte Protein einerseits wildtypisches DJ-1 und bildet andererseits häufig instabile fehlgefaltete Strukturen, die zügig durch das Proteasom abgebaut werden (Klein und Westenberger 2012). Infolge des dadurch entstehenden Proteinmangels ist die neuroprotektive bzw. antioxidative Funktion von DJ-1 eingeschränkt (Klein und Westenberger 2012). Die Parkinson-Krankheit ist dabei vermutlich das Ergebnis einer langen Kausalkette, beginnend mit der DJ-1-Mutation, die zu einer blockierten bzw. reduzierten CMA-Aktivität führt, wodurch sich verstärkt  $\alpha$ -Synuclein anreichert und die Degeneration der Neuronen begünstigt (Sala *et al.* 2016). In Bezug auf Krebs nutzt die Zelle den Vorteil, dass antioxidative Proteine, wie DJ-1 heraufreguliert werden, um vor ROS-induzierter Zellschädigung zu schützen (Raninga *et al.* 2014). Auf Grund dessen ist DJ-1 bei vielen Krebsarten mit Tumorproliferation, Überleben und Chemoresistenz assoziiert (Raninga *et al.* 2014).

Hinsichtlich der eigenen Ergebnisse scheint die Expression von TDP-43 eine Stressantwort in der Zelle herbeizuführen, die mit einer vermehrten Produktion von Hitzeschockproteinen, wie

Hsp31 und Ssa4, einhergeht. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den konkreten Zusammenhang zwischen TDP-43 und Hsp31 zu klären. Möglicherweise fördert das Chaperon den Abbau von fehlgefaltetem oder aggregiertem TDP-43, ähnlich wie bei  $\alpha$ -Synuclein. Vielleicht gibt es bezüglich ALS und der Parkinson-Erkrankung einen gemeinsamen pathologischen Mechanismus, der die Ursache für beide Krankheitsbilder darstellt. Dadurch eröffnet sich die Chance, mit einem therapeutischen Ansatz zwei neurodegenerative Erkrankungen zu behandeln.

## 6 Literaturverzeichnis

(2007). "Das MSD Manual der Diagnostik und Therapie." Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH 7. Auflage.

Ajrroud-Driss, S. and T. Siddique (2015). "Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." *Biochim Biophys Acta* 1852(4): 679-684.

Alberti, S., A. D. Gitler and S. Lindquist (2007). "A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 24(10): 913-919.

Ammerer, G., C. P. Hunter, J. H. Rothman, G. C. Saari, L. A. Valls and T. H. Stevens (1986). "PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors." *Mol Cell Biol* 6(7): 2490-2499.

Andersen, P. M. and A. Al-Chalabi (2011). "Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know?" *Nat Rev Neurol* 7(11): 603-615.

Arai, T., M. Hasegawa, H. Akiyama, K. Ikeda, T. Nonaka, H. Mori, D. Mann, K. Tsuchiya, M. Yoshida, Y. Hashizume and T. Oda (2006). "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Biochem Biophys Res Commun* 351(3): 602-611.

Aran, F. A. (1850). "Recherches sur une maladie non encore décrite du système musculaire (atrophie musculaire progressive)." *Archives générales de médecine (Arch Gen Med)* 1850, vol. 24, pp. 172-214.

Arnakola, M., M. P. Hart and A. D. Gitler (2011). "TDP-43 toxicity in yeast." *Methods* 53(3): 238-245.

Arnakola, M., M. J. Higgins, M. D. Figley, S. J. Barmada, E. A. Scarborough, Z. Diaz, X. Fang, J. Shorter, N. J. Krogan, S. Finkbeiner, R. V. Farese, Jr. and A. D. Gitler (2012). "Inhibition of RNA lariat debranching enzyme suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models." *Nat Genet* 44(12): 1302-1309.

Arrasate, M., S. Mitra, E. S. Schweitzer, M. R. Segal and S. Finkbeiner (2004). "Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death." *Nature* 431(7010): 805-810.

Atkin, G. and H. Paulson (2014). "Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease." *Front Mol Neurosci* 7: 63.

Auffarth, K., H. Arlt, J. Lachmann, M. Cabrera and C. Ungermann (2014). "Tracking of the dynamic localization of the Rab-specific HOPS subunits reveal their distinct interaction with Ypt7 and vacuoles." *Cell Logist* 4: e29191.

Aulas, A. and C. Vande Velde (2015). "Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS?" *Front Cell Neurosci* 9: 423.

- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S. D. Emr (2002A). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* 3(2): 271-282.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland and S. D. Emr (2002B). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* 3(2): 283-289.
- Baixaui, F., C. Lopez-Otin and M. Mittelbrunn (2014). "Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness." *Front Immunol* 5: 403.
- Balderhaar, H. J. and C. Ungermann (2013). "CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion." *J Cell Sci* 126(Pt 6): 1307-1316.
- Bandara, P. D., J. A. Flattery-O'Brien, C. M. Grant and I. W. Dawes (1998). "Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* UTH1 gene in the oxidative-stress response." *Curr Genet* 34(4): 259-268.
- Barmada, S. J., A. Serio, A. Arjun, B. Bilican, A. Daub, D. M. Ando, A. Tsvetkov, M. Pleiss, X. Li, D. Peisach, C. Shaw, S. Chandran and S. Finkbeiner (2014). "Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models." *Nat Chem Biol* 10(8): 677-685.
- Bastow, E. L., C. W. Gourlay and M. F. Tuite (2011). "Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis." *Biochem Soc Trans* 39(5): 1482-1487.
- Belgareh-Touze, N., S. Leon, Z. Erpapazoglou, M. Stawiecka-Mirota, D. Urban-Grimal and R. Haguenaer-Tsapis (2008). "Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5): 791-796.
- Bell, C. (1830). "The nervous system of the human body: embracing the papers delivered to the Royal Society on the subject of the nerves." Longman, London.
- Belzil, V. V., T. F. Gendron and L. Petrucelli (2013). "RNA-mediated toxicity in neurodegenerative disease." *Mol Cell Neurosci* 56: 406-419.
- Bjørkøy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark and T. Johansen (2005). "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death." *J Cell Biol* 171(4): 603-614.
- Black, J. W., A. F. Crowther, R. G. Shanks, L. H. Smith and A. C. Dornhorst (1964). "A New Adrenergic Betareceptor Antagonist." *Lancet* 1(7342): 1080-1081.
- Böckler, S. and B. Westermann (2014). "Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast." *Dev Cell* 28(4): 450-458.
- Boillée, S., C. Vande Velde and D. W. Cleveland (2006). "ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors." *Neuron* 52(1): 39-59.

- Bose, J. K., C. C. Huang and C. K. Shen (2011). "Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43." *J Biol Chem* 286(52): 44441-44448.
- Boya, P., F. Reggiori and P. Codogno (2013). "Emerging regulation and functions of autophagy." *Nat Cell Biol* 15(7): 713-720.
- Boyault, C., B. Gilquin, Y. Zhang, V. Rybin, E. Garman, W. Meyer-Klaucke, P. Matthias, C. W. Muller and S. Khochbin (2006). "HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover." *EMBO J* 25(14): 3357-3366.
- Boyault, C., Y. Zhang, S. Fritah, C. Caron, B. Gilquin, S. H. Kwon, C. Garrido, T. P. Yao, C. Vourc'h, P. Matthias and S. Khochbin (2007). "HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates." *Genes Dev* 21(17): 2172-2181.
- Bozzo, F., I. Salvatori, F. Iacovelli, A. Mirra, S. Rossi, M. Cozzolino, M. Falconi, C. Valle and M. T. Carri (2016). "Structural insights into the multi-determinant aggregation of TDP-43 in motor neuron-like cells." *Neurobiol Dis* 94: 63-72.
- Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter and J. D. Boeke (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." *Yeast* 14(2): 115-132.
- Braun, R. J. (2015). "Ubiquitin-dependent proteolysis in yeast cells expressing neurotoxic proteins." *Front Mol Neurosci* 8: 8.
- Braun, R. J., S. Buttner, J. Ring, G. Kroemer and F. Madeo (2010). "Nervous yeast: modeling neurotoxic cell death." *Trends Biochem Sci* 35(3): 135-144.
- Braun, R. J., N. Kinkl, H. Zischka and M. Ueffing (2009). "16-BAC/SDS-PAGE analysis of membrane proteins of yeast mitochondria purified by free flow electrophoresis." *Methods Mol Biol* 528: 83-107.
- Braun, R. J., C. Sommer, D. Carmona-Gutierrez, C. M. Khoury, J. Ring, S. Buttner and F. Madeo (2011). "Neurotoxic 43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) triggers mitochondrion-dependent programmed cell death in yeast." *J Biol Chem* 286(22): 19958-19972.
- Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter and M. C. Gustin (1993). "An osmosensing signal transduction pathway in yeast." *Science* 259(5102): 1760-1763.
- Bryant, N. J. and T. H. Stevens (1998). "Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 230-247.
- Budini, M., V. Romano, Z. Quadri, E. Buratti and F. E. Baralle (2015). "TDP-43 loss of cellular function through aggregation requires additional structural determinants beyond its C-terminal Q/N prion-like domain." *Hum Mol Genet* 24(1): 9-20.

- Buratti, E. (2015). "Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease." *Adv Genet* 91: 1-53.
- Büttner, S., L. Habernig, F. Broeskamp, D. Ruli, F. N. Vogtle, M. Vlachos, F. Macchi, V. Kuttner, D. Carmona-Gutierrez, T. Eisenberg, J. Ring, M. Markaki, A. A. Taskin, S. Benke, C. Ruckstuhl, R. Braun, C. Van den Haute, T. Bammens, A. van der Perren, K. U. Frohlich, J. Winderickx, G. Kroemer, V. Baekelandt, N. Tavernarakis, G. G. Kovacs, J. Dengjel, C. Meisinger, S. J. Sigrist and F. Madeo (2013). "Endonuclease G mediates alpha-synuclein cytotoxicity during Parkinson's disease." *EMBO J* 32(23): 3041-3054.
- Caccamo, A., S. Majumder, J. J. Deng, Y. Bai, F. B. Thornton and S. Oddo (2009). "Rapamycin rescues TDP-43 mislocalization and the associated low molecular mass neurofilament instability." *J Biol Chem* 284(40): 27416-27424.
- Carroll, A. S. and E. K. O'Shea (2002). "Pho85 and signaling environmental conditions." *Trends Biochem Sci* 27(2): 87-93.
- Cascarina, S. M. and E. D. Ross (2014). "Yeast prions and human prion-like proteins: sequence features and prediction methods." *Cell Mol Life Sci* 71(11): 2047-2063.
- Cascella, R., C. Capitini, G. Fani, C. M. Dobson, C. Cecchi and F. Chiti (2016). "Quantification of the Relative Contributions of Loss-of-function and Gain-of-function Mechanisms in TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Proteinopathies." *J Biol Chem* 291(37): 19437-19448.
- Chang, H. Y., S. C. Hou, T. D. Way, C. H. Wong and I. F. Wang (2013). "Heat-shock protein dysregulation is associated with functional and pathological TDP-43 aggregation." *Nat Commun* 4: 2757.
- Charcot, J.-M. and A. Joffrey (1869). "Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle epiniere." *Arch Physiol Neurol Pathol* 2: 744-754.
- Charcot, J.-M. (1874). "De la sclérose latérale amyotrophique." *Prog Med.* 23; 24; 29:235-237. 341-232; 453-235.
- Charcot, J.-M. and P. Marie (1885). "Deux nouveaux cas de sclérose latérale amyotrophique suivis d'autopsie." *Arch. Neurol. (Paris)* 1885; 10:1-35.
- Chen, H. J., J. C. Mitchell, S. Novoselov, J. Miller, A. L. Nishimura, E. L. Scotter, C. A. Vance, M. E. Cheetham and C. E. Shaw (2016). "The heat shock response plays an important role in TDP-43 clearance: evidence for dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." *Brain* 139(Pt 5): 1417-1432.
- Chen-Plotkin, A. S., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2010). "TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease." *Nat Rev Neurol* 6(4): 211-220.
- Chung, M. J. and Y. L. Suh (2002). "Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Ultrastruct Pathol* 26(1): 3-7.

Ciechanover, A. and Y. T. Kwon (2015). "Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies." *Exp Mol Med* 47: e147.

Ciechanover, A. and Y. T. Kwon (2017). "Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration." *Front Neurosci* 11: 185.

Cirulli, E. T., B. N. Lasseigne, S. Petrovski, P. C. Sapp, P. A. Dion, C. S. Leblond, J. Couthouis, Y. F. Lu, Q. Wang, B. J. Krueger, Z. Ren, J. Keebler, Y. Han, S. E. Levy, B. E. Boone, J. R. Wimbish, L. L. Waite, A. L. Jones, J. P. Carulli, A. G. Day-Williams, J. F. Staropoli, W. W. Xin, A. Chesi, A. R. Raphael, D. McKenna-Yasek, J. Cady, J. M. Vianney de Jong, K. P. Kenna, B. N. Smith, S. Topp, J. Miller, A. Gkazi, F. S. Consortium, A. Al-Chalabi, L. H. van den Berg, J. Veldink, V. Silani, N. Ticozzi, C. E. Shaw, R. H. Baloh, S. Appel, E. Simpson, C. Lagier-Tourenne, S. M. Pulst, S. Gibson, J. Q. Trojanowski, L. Elman, L. McCluskey, M. Grossman, N. A. Shneider, W. K. Chung, J. M. Ravits, J. D. Glass, K. B. Sims, V. M. Van Deerlin, T. Maniatis, S. D. Hayes, A. Ordureau, S. Swarup, J. Landers, F. Baas, A. S. Allen, R. S. Bedlack, J. W. Harper, A. D. Gitler, G. A. Rouleau, R. Brown, M. B. Harms, G. M. Cooper, T. Harris, R. M. Myers and D. B. Goldstein (2015). "Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways." *Science* 347(6229): 1436-1441.

Couthouis, J., M. P. Hart, J. Shorter, M. DeJesus-Hernandez, R. Erion, R. Oristano, A. X. Liu, D. Ramos, N. Jethava, D. Hosangadi, J. Epstein, A. Chiang, Z. Diaz, T. Nakaya, F. Ibrahim, H. J. Kim, J. A. Solski, K. L. Williams, J. Mojsilovic-Petrovic, C. Ingre, K. Boylan, N. R. Graff-Radford, D. W. Dickson, D. Clay-Falcone, L. Elman, L. McCluskey, R. Greene, R. G. Kalb, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, A. Ludolph, W. Robberecht, P. M. Andersen, G. A. Nicholson, I. P. Blair, O. D. King, N. M. Bonini, V. Van Deerlin, R. Rademakers, Z. Mourelatos and A. D. Gitler (2011). "A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(52): 20881-20890.

Cruveilhier, J. (1853). "Sur la paralysie musculaire, progressive, atrophique." *Bull. Acad. Méd. (Paris)* 18, 490-502, 546-83, Paris.

Da Cruz, S. and D. W. Cleveland (2011). "Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond." *Curr Opin Neurobiol* 21(6): 904-919.

Dantuma, N. P. and L. C. Bott (2014). "The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution." *Front Mol Neurosci* 7: 70.

Darsow, T., S. E. Rieder and S. D. Emr (1997). "A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole." *J Cell Biol* 138(3): 517-529.

de Godoy, L. M., J. V. Olsen, J. Cox, M. L. Nielsen, N. C. Hubner, F. Frohlich, T. C. Walther and M. Mann (2008). "Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast." *Nature* 455(7217): 1251-1254.

- de Godoy, L. M., J. V. Olsen, G. A. de Souza, G. Li, P. Mortensen and M. Mann (2006). "Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system." *Genome Biol* 7(6): R50.
- Demirezen, S. Ö., M.; Beksaç, S. (2012). "The Association Between Autophagy and Ovarian Cancer." *Gynecol Obstet Reprod Med*(18): 118-122.
- Dengjel, J. and H. Abeliovich (2017). "Roles of mitophagy in cellular physiology and development." *Cell Tissue Res* 367(1): 95-109.
- Dobzinski, N., S. G. Chuartzman, R. Kama, M. Schuldiner and J. E. Gerst (2015). "Starvation-Dependent Regulation of Golgi Quality Control Links the TOR Signaling and Vacuolar Protein Sorting Pathways." *Cell Rep* 12(11): 1876-1886.
- Dupré, S., D. Urban-Grimal and R. Haguener-Tsapis (2004). "Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 89-111.
- Edens, B. M., N. Miller and Y. C. Ma (2016). "Impaired Autophagy and Defective Mitochondrial Function: Converging Paths on the Road to Motor Neuron Degeneration." *Front Cell Neurosci* 10: 44.
- Ederle, H. and D. Dormann (2017). "TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm." *FEBS Lett* 591(11): 1489-1507.
- Edgar, J. R., K. Willen, G. K. Gouras and C. E. Futter (2015). "ESCRTs regulate amyloid precursor protein sorting in multivesicular bodies and intracellular amyloid-beta accumulation." *J Cell Sci* 128(14): 2520-2528.
- Elden, A. C., H. J. Kim, M. P. Hart, A. S. Chen-Plotkin, B. S. Johnson, X. Fang, M. Armakola, F. Geser, R. Greene, M. M. Lu, A. Padmanabhan, D. Clay-Falcone, L. McCluskey, L. Elman, D. Juhr, P. J. Gruber, U. Rub, G. Auburger, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, V. M. Van Deerlin, N. M. Bonini and A. D. Gitler (2010). "Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS." *Nature* 466(7310): 1069-1075.
- Fader, C. M. and M. I. Colombo (2006). "Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation." *Autophagy* 2(2): 122-125.
- Fang, N. N., G. T. Chan, M. Zhu, S. A. Comyn, A. Persaud, R. J. Deshaies, D. Rotin, J. Gsponer and T. Mayor (2014). "Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heat stress." *Nat Cell Biol* 16(12): 1227-1237.
- Fang, N. N., M. Zhu, A. Rose, K. P. Wu and T. Mayor (2016). "Deubiquitinase activity is required for the proteasomal degradation of misfolded cytosolic proteins upon heat-stress." *Nat Commun* 7: 12907.
- Feng, Y., D. He, Z. Yao and D. J. Klionsky (2014). "The machinery of macroautophagy." *Cell Res* 24(1): 24-41.

- Fiesel, F. C. and P. J. Kahle (2011). "TDP-43 and FUS/TLS: cellular functions and implications for neurodegeneration." *FEBS J* 278(19): 3550-3568.
- Fiesel, F. C., A. Voigt, S. S. Weber, C. Van den Haute, A. Waldenmaier, K. Gerner, M. Walter, M. L. Anderson, J. V. Kern, T. M. Rasse, T. Schmidt, W. Springer, R. Kirchner, M. Bonin, M. Neumann, V. Baekelandt, M. Alunni-Fabbroni, J. B. Schulz and P. J. Kahle (2010). "Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6." *EMBO J* 29(1): 209-221.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerod, E. M. Fisher, A. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark and A. Simonsen (2007). "Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease." *J Cell Biol* 179(3): 485-500.
- Finley, D., H. D. Ulrich, T. Sommer and P. Kaiser (2012). "The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 192(2): 319-360.
- Fontana, F., K. Siva and M. A. Denti (2015). "A network of RNA and protein interactions in Fronto Temporal Dementia." *Front Mol Neurosci* 8: 9.
- Forman, M. S., J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2004). "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs." *Nat Med* 10(10): 1055-1063.
- Fraldi, A., A. D. Klein, D. L. Medina and C. Settembre (2016). "Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction." *Annu Rev Neurosci* 39: 277-295.
- Franz, A., E. Kevei and T. Hoppe (2015). "Double-edged alliance: mitochondrial surveillance by the UPS and autophagy." *Curr Opin Cell Biol* 37: 18-27.
- Frazier, A. E., C. Kiu, D. Stojanovski, N. J. Hoogenraad and M. T. Ryan (2006). "Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells." *Biol Chem* 387(12): 1551-1558.
- Fujita, Y., Y. Mizuno, M. Takatama and K. Okamoto (2008). "Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS." *J Neurol Sci* 269(1-2): 30-34.
- Fukunaga, K., Y. Shinoda and H. Tagashira (2015). "The role of SIGMAR1 gene mutation and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." *J Pharmacol Sci* 127(1): 36-41.
- Gari, E., L. Piedrafita, M. Aldea and E. Herrero (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 13(9): 837-848.
- Gelperin, D., J. Weigle, K. Nelson, P. Roseboom, K. Irie, K. Matsumoto and S. Lemmon (1995). "14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11539-11543.

- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis and M. Johnston (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Nature* 418(6896): 387-391.
- Grad, L. I., S. M. Fernando and N. R. Cashman (2015). "From molecule to molecule and cell to cell: prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurobiol Dis* 77: 257-265.
- Guerrero, E. N., H. Wang, J. Mitra, P. M. Hegde, S. E. Stowell, N. F. Liachko, B. C. Kraemer, R. M. Garruto, K. S. Rao and M. L. Hegde (2016). "TDP-43/FUS in motor neuron disease: Complexity and challenges." *Prog Neurobiol* 145-146: 78-97.
- Guiney, E. L., T. Klecker and S. D. Emr (2016). "Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex." *Mol Biol Cell* 27(25): 4043-4054.
- Hagen, D. C., G. McCaffrey and G. F. Sprague, Jr. (1986). "Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(5): 1418-1422.
- Hammerling, B. C., R. H. Najor, M. Q. Cortez, S. E. Shires, L. J. Leon, E. R. Gonzalez, D. Boassa, S. Phan, A. Thor, R. E. Jimenez, H. Li, R. N. Kitsis, G. W. Dorn II, J. Sadoshima, M. H. Ellisman and A. B. Gustafsson (2017). "A Rab5 endosomal pathway mediates Parkin-dependent mitochondrial clearance." *Nat Commun* 8: 14050.
- Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* 475(7356): 324-332.
- Hasim, S., N. A. Hussin, F. Alomar, K. R. Bidasee, K. W. Nickerson and M. A. Wilson (2014). "A glutathione-independent glyoxalase of the DJ-1 superfamily plays an important role in managing metabolically generated methylglyoxal in *Candida albicans*." *J Biol Chem* 289(3): 1662-1674.
- Hebron, M. L., I. Lonskaya, K. Sharpe, P. P. Weerasinghe, N. K. Algarzae, A. R. Shekoyan and C. E. Moussa (2013). "Parkin ubiquitinates Tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6)." *J Biol Chem* 288(6): 4103-4115.
- Herzig, S., E. Raemy, S. Montessuit, J. L. Veuthey, N. Zamboni, B. Westermann, E. R. Kunji and J. C. Martinou (2012). "Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier." *Science* 337(6090): 93-96.

- Hijioka, M., M. Inden, D. Yanagisawa and Y. Kitamura (2017). "DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders." *Biol Pharm Bull* 40(5): 548-552.
- Hirano, A., I. Nakano, L. T. Kurland, D. W. Mulder, P. W. Holley and G. Saccomanno (1984). "Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis." *J Neuropathol Exp Neurol* 43(5): 471-480.
- Höhfeld, J., M. Veenhuis and W. H. Kunau (1991). "PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis." *J Cell Biol* 114(6): 1167-1178.
- Hong, K., Y. Li, W. Duan, Y. Guo, H. Jiang, W. Li and C. Li (2012). "Full-length TDP-43 and its C-terminal fragments activate mitophagy in NSC34 cell line." *Neurosci Lett* 530(2): 144-149.
- Huang, C. C., J. K. Bose, P. Majumder, K. H. Lee, J. T. Huang, J. K. Huang and C. K. Shen (2014). "Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43." *J Cell Sci* 127(Pt 14): 3024-3038.
- Huang, D., H. Friesen and B. Andrews (2007). "Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast." *Mol Microbiol* 66(2): 303-314.
- Huang, W. P., S. V. Scott, J. Kim and D. J. Klionsky (2000). "The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways." *J Biol Chem* 275(8): 5845-5851.
- Huber, L. A. and D. Teis (2016). "Lysosomal signaling in control of degradation pathways." *Curr Opin Cell Biol* 39: 8-14.
- Hübers, A., J. H. Weishaupt and A. C. Ludolph (2013). "[Genetics of amyotrophic lateral sclerosis]." *Nervenarzt* 84(10): 1213-1219.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman and E. K. O'Shea (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* 425(6959): 686-691.
- Hurley, J. H. and P. I. Hanson (2010). "Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8): 556-566.
- Igaz, L. M., L. K. Kwong, A. Chen-Plotkin, M. J. Winton, T. L. Unger, Y. Xu, M. Neumann, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2009). "Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies." *J Biol Chem* 284(13): 8516-8524.
- Igaz, L. M., L. K. Kwong, Y. Xu, A. C. Truax, K. Uryu, M. Neumann, C. M. Clark, L. B. Elman, B. L. Miller, M. Grossman, L. F. McCluskey, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2008). "Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Am J Pathol* 173(1): 182-194.

- Iguchi, Y., L. Eid, M. Parent, G. Soucy, C. Bareil, Y. Riku, K. Kawai, S. Takagi, M. Yoshida, M. Katsuno, G. Sobue and J. P. Julien (2016). "Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43." *Brain* 139(Pt 12): 3187-3201.
- Inoue, Y. and D. J. Klionsky (2010). "Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *Semin Cell Dev Biol* 21(7): 664-670.
- Iwata, A., B. E. Riley, J. A. Johnston and R. R. Kopito (2005). "HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin." *J Biol Chem* 280(48): 40282-40292.
- Jackrel, M. E. and J. Shorter (2014). "Potentiated Hsp104 variants suppress toxicity of diverse neurodegenerative disease-linked proteins." *Dis Model Mech* 7(10): 1175-1184.
- Jao, C. C., M. J. Ragusa, R. E. Stanley and J. H. Hurley (2013). "A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(14): 5486-5491.
- Jarmoszewicz, K., K. Lukasiak, H. Riezman and J. Kaminska (2012). "Rsp5 ubiquitin ligase is required for protein trafficking in *Saccharomyces cerevisiae* COPI mutants." *PLoS One* 7(6): e39582.
- Jazwinski, S. M. and A. Kriete (2012). "The yeast retrograde response as a model of intracellular signaling of mitochondrial dysfunction." *Front Physiol* 3: 139.
- Jellinger, K. A. (2009). "Recent advances in our understanding of neurodegeneration." *J Neural Transm (Vienna)* 116(9): 1111-1162.
- Jiang, Z., W. Wang, G. Perry, X. Zhu and X. Wang (2015). "Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis." *Transl Neurodegener* 4: 14.
- Johnson, B. S., J. M. McCaffery, S. Lindquist and A. D. Gitler (2008). "A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17): 6439-6444.
- Johnson, B. S., D. Snead, J. J. Lee, J. M. McCaffery, J. Shorter and A. D. Gitler (2009). "TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity." *J Biol Chem* 284(30): 20329-20339.
- Joyce, P. I., P. Fratta, E. M. Fisher and A. Acevedo-Arozena (2011). "SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments." *Mamm Genome* 22(7-8): 420-448.
- Ju, J. S., R. A. Fuentealba, S. E. Miller, E. Jackson, D. Piwnicka-Worms, R. H. Baloh and C. C. Weihl (2009). "Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease." *J Cell Biol* 187(6): 875-888.
- Julien, J. P. (2001). "Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded." *Cell* 104(4): 581-591.

- Juris, L., M. Montino, P. Rube, P. Schlotterhose, M. Thumm and R. Krick (2015). "PI3P binding by Atg21 organises Atg8 lipidation." *EMBO J* 34(7): 955-973.
- Kabashi, E., P. N. Valdmanis, P. Dion, D. Spiegelman, B. J. McConkey, C. Vande Velde, J. P. Bouchard, L. Lacomblez, K. Pochigaeva, F. Salachas, P. F. Pradat, W. Camu, V. Meininger, N. Dupre and G. A. Rouleau (2008). "TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." *Nat Genet* 40(5): 572-574.
- Kachroo, A. H., J. M. Laurent, C. M. Yellman, A. G. Meyer, C. O. Wilke and E. M. Marcotte (2015). "Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity." *Science* 348(6237): 921-925.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi and Y. Ohsumi (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." *J Cell Biol* 150(6): 1507-1513.
- Kanneganti, V., R. Kama and J. E. Gerst (2011). "Btn3 is a negative regulator of Btn2-mediated endosomal protein trafficking and prion curing in yeast." *Mol Biol Cell* 22(10): 1648-1663.
- Karpichev, I. V. and G. M. Small (1998). "Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 18(11): 6560-6570.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi and S. D. Emr (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12): 893-905.
- Kaufmann, A., V. Beier, H. G. Franquelim and T. Wollert (2014). "Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly." *Cell* 156(3): 469-481.
- Kee, Y., N. Lyon and J. M. Huijbrechtse (2005). "The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme." *EMBO J* 24(13): 2414-2424.
- Ketela, T., R. Green and H. Bussey (1999). "*Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway." *J Bacteriol* 181(11): 3330-3340.
- Kiernan, M. C., S. Vucic, B. C. Cheah, M. R. Turner, A. Eisen, O. Hardiman, J. R. Burrell and M. C. Zoing (2011). "Amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet* 377(9769): 942-955.
- Kim, S. H., N. P. Shanware, M. J. Bowler and R. S. Tibbetts (2010). "Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA." *J Biol Chem* 285(44): 34097-34105.
- Kim, S. H., Y. Shi, K. A. Hanson, L. M. Williams, R. Sakasai, M. J. Bowler and R. S. Tibbetts (2009). "Potentiation of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated TDP-43 aggregation by the proteasome-targeting factor, ubiquilin 1." *J Biol Chem* 284(12): 8083-8092.

- Kirisako, T., M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda and Y. Ohsumi (1999). "Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast." *J Cell Biol* 147(2): 435-446.
- Kirisako, T., Y. Ichimura, H. Okada, Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. Ohsumi, T. Takao, T. Noda and Y. Ohsumi (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(2): 263-276.
- Kissov, I., M. Deffieu, S. Manon and N. Camougrand (2004). "Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria." *J Biol Chem* 279(37): 39068-39074.
- Klein, C. and A. Westenberger (2012). "Genetics of Parkinson's disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1): a008888.
- Klionsky, D. J. (2005). "The molecular machinery of autophagy: unanswered questions." *J Cell Sci* 118(Pt 1): 7-18.
- Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 931-937.
- Klionsky, D. J. and B. A. Schulman (2014). "Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins." *Nat Struct Mol Biol* 21(4): 336-345.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba., S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." *Nature* 441 (7095): 880–884.
- Kryndushkin, D. and F. Shewmaker (2011). "Modeling ALS and FTLN proteinopathies in yeast: an efficient approach for studying protein aggregation and toxicity." *Prion* 5(4): 250-257.
- Kryndushkin, D., R. B. Wickner and F. Shewmaker (2011). "FUS/TLS forms cytoplasmic aggregates, inhibits cell growth and interacts with TDP-43 in a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis." *Protein Cell* 2(3): 223-236.
- Kushnirov, V. V. (2000). "Rapid and reliable protein extraction from yeast." *Yeast* 16(9): 857-860.
- Lagier-Tourenne, C. and D. W. Cleveland (2009). "Rethinking ALS: the FUS about TDP-43." *Cell* 136(6): 1001-1004.
- Lagier-Tourenne, C., M. Polymenidou and D. W. Cleveland (2010). "TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration." *Hum Mol Genet* 19(R1): R46-64.
- Lee, E. B., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2011A). "Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration." *Nat Rev Neurosci* 13(1): 38-50.

- Lee, J. A., A. Beigneux, S. T. Ahmad, S. G. Young and F. B. Gao (2007). "ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration." *Curr Biol* 17(18): 1561-1567.
- Lee, J. A. and F. B. Gao (2009). "Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia." *J Neurosci* 29(26): 8506-8511.
- Lee, J. A., L. Liu and F. B. Gao (2009). "Autophagy defects contribute to neurodegeneration induced by dysfunctional ESCRT-III." *Autophagy* 5(7): 1070-1072.
- Lee, J. Y., H. Koga, Y. Kawaguchi, W. Tang, E. Wong, Y. S. Gao, U. B. Pandey, S. Kaushik, E. Tresse, J. Lu, J. P. Taylor, A. M. Cuervo and T. P. Yao (2010). "HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy." *EMBO J* 29(5): 969-980.
- Lee, S. and H. J. Kim (2015). "Prion-like Mechanism in Amyotrophic Lateral Sclerosis: are Protein Aggregates the Key?" *Exp Neurobiol* 24(1): 1-7.
- Lee, T., Y. R. Li, C. Ingre, M. Weber, T. Grehl, O. Gredal, M. de Carvalho, T. Meyer, O. B. Tysnes, G. Auburger, S. Gispert, N. M. Bonini, P. M. Andersen and A. D. Gitler (2011B). "Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients." *Hum Mol Genet* 20(9): 1697-1700.
- Leigh, P. N. and K. Ray-Chaudhuri (1994). "Motor neuron disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57(8): 886-896.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" *J Clin Invest* 115(10): 2679-2688.
- Li, S. C. and P. M. Kane (2009). "The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads." *Biochim Biophys Acta* 1793(4): 650-663.
- Li, Y. R., O. D. King, J. Shorter and A. D. Gitler (2013). "Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis." *J Cell Biol* 201(3): 361-372.
- Lin, C. H., J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan and S. D. Emr (2008). "Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface." *Cell* 135(4): 714-725.
- Ling, S. C., C. P. Albuquerque, J. S. Han, C. Lagier-Tourenne, S. Tokunaga, H. Zhou and D. W. Cleveland (2010). "ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(30): 13318-13323.
- Ling, S. C., M. Polymenidou and D. W. Cleveland (2013). "Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis." *Neuron* 79(3): 416-438.

- Liu, X. M., L. L. Sun, W. Hu, Y. H. Ding, M. Q. Dong and L. L. Du (2015). "ESCRTs Cooperate with a Selective Autophagy Receptor to Mediate Vacuolar Targeting of Soluble Cargos." *Mol Cell* 59(6): 1035-1042.
- Lodder, A. L., T. K. Lee and R. Ballester (1999). "Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 152(4): 1487-1499.
- Loewith, R. and M. N. Hall (2011). "Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control." *Genetics* 189(4): 1177-1201.
- Lu, K., I. Psakhye, S. Jentsch (2014). "Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family." *Cell*. 158(3):549-63.
- Lu, R., D. G. Drubin and Y. Sun (2016). "Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance." *J Cell Sci* 129(8): 1531-1536.
- MacDonald, C., D. K. Stringer and R. C. Piper (2012). "Sna3 is an Rsp5 adaptor protein that relies on ubiquitination for its MVB sorting." *Traffic* 13(4): 586-598.
- MacGurn, J. A., P. C. Hsu, M. B. Smolka and S. D. Emr (2011). "TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor." *Cell* 147(5): 1104-1117.
- Magrané, J., C. Cortez, W. B. Gan and G. Manfredi (2014). "Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models." *Hum Mol Genet* 23(6): 1413-1424.
- Manil-Segalen, M., C. Lefebvre, E. Culetto and R. Legouis (2012). "Need an ESCRT for autophagosomal maturation?" *Commun Integr Biol* 5(6): 566-571.
- Mao, K., K. Wang, M. Zhao, T. Xu and D. J. Klionsky (2011). "Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 193(4): 755-767.
- Mari, M., S. A. Tooze and F. Reggiori (2011). "The puzzling origin of the autophagosomal membrane." *F1000 Biol Rep* 3: 25.
- Marshall, P. A., Y. I. Krimkevich, R. H. Lark, J. M. Dyer, M. Veenhuis and J. M. Goodman (1995). "Pmp27 promotes peroxisomal proliferation." *J Cell Biol* 129(2): 345-355.
- Mazzulli, J. R., Y. H. Xu, Y. Sun, A. L. Knight, P. J. McLean, G. A. Caldwell, E. Sidransky, G. A. Grabowski and D. Krainc (2011). "Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies." *Cell* 146(1): 37-52.
- McNew, J. A., F. Parlati, R. Fukuda, R. J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T. H. Sollner and J. E. Rothman (2000). "Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins." *Nature* 407(6801): 153-159.

- Mehta, A., M. Beck, A. Linhart, G. Sunder-Plassmann and U. Widmer (2006). History of lysosomal storage diseases: an overview. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann. Oxford.
- Melentijevic, I., M. L. Toth, M. L. Arnold, R. J. Guasp, G. Harinath, K. C. Nguyen, D. Taub, J. A. Parker, C. Neri, C. V. Gabel, D. H. Hall and M. Driscoll (2017). "C. elegans neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress." *Nature* 542(7641): 367-371.
- Michaillat, L., T. L. Baars and A. Mayer (2012). "Cell-free reconstitution of vacuole membrane fragmentation reveals regulation of vacuole size and number by TORC1." *Mol Biol Cell* 23(5): 881-895.
- Michaillat, L. and A. Mayer (2013). "Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLoS One* 8(2): e54160.
- Miller-Fleming, L., P. Antas, T. F. Pais, J. L. Smalley, F. Giorgini and T. F. Outeiro (2014). "Yeast DJ-1 superfamily members are required for diauxic-shift reprogramming and cell survival in stationary phase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(19): 7012-7017.
- Morel, E., Z. Chamoun, Z. M. Lasiecka, R. B. Chan, R. L. Williamson, C. Vetanovetz, C. Dall'Armi, S. Simoes, K. S. Point Du Jour, B. D. McCabe, S. A. Small and G. Di Paolo (2013). "Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system." *Nat Commun* 4: 2250.
- Morgan, S. and R. W. Orrell (2016). "Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." *Br Med Bull* 119(1): 87-98.
- Morvan, J., M. Froissard, R. Haguenaer-Tsapis and D. Urban-Grimal (2004). "The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies." *Traffic* 5(5): 383-392.
- Mueller-Steiner, S., Y. Zhou, H. Arai, E. D. Roberson, B. Sun, J. Chen, X. Wang, G. Yu, L. Esposito, L. Mucke and L. Gan (2006). "Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease." *Neuron* 51(6): 703-714.
- Müller, M., O. Schmidt, M. Angelova, K. Faserl, S. Weys, L. Kremser, T. Pfaffenwimmer, T. Dalik, C. Kraft, Z. Trajanoski, H. Lindner and D. Teis (2015). "The coordinated action of the MVB pathway and autophagy ensures cell survival during starvation." *Elife* 4: e07736.
- Mullins, C. and J. S. Bonifacino (2001). "The molecular machinery for lysosome biogenesis." *Bioessays* 23(4): 333-343.
- Murrow, L., R. Malhotra and J. Debnath (2015). "ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function." *Nat Cell Biol* 17(3): 300-310.
- Nair, U., W. L. Yen, M. Mari, Y. Cao, Z. Xie, M. Baba, F. Reggiori and D. J. Klionsky (2012). "A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis." *Autophagy* 8(5): 780-793.

- Nass, R., K. W. Cunningham and R. Rao (1997). "Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance." *J Biol Chem* 272(42): 26145-26152.
- Natale, G., P. Lenzi, G. Lazzeri, A. Falleni, F. Biagioni, L. Ryskalin and F. Fornai (2015). "Compartment-dependent mitochondrial alterations in experimental ALS, the effects of mitophagy and mitochondriogenesis." *Front Cell Neurosci* 9: 434.
- Neumann, M., D. M. Sampathu, L. K. Kwong, A. C. Truax, M. C. Micsenyi, T. T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C. M. Clark, L. F. McCluskey, B. L. Miller, E. Masliah, I. R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H. A. Kretzschmar, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Science* 314(5796): 130-133.
- Nihei, Y., D. Ito and N. Suzuki (2012). "Roles of ataxin-2 in pathological cascades mediated by TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) and Fused in Sarcoma (FUS)." *J Biol Chem* 287(49): 41310-41323.
- Ong, S. E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey and M. Mann (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." *Mol Cell Proteomics* 1(5): 376-386.
- Opattova, A., M. Cente, M. Novak and P. Filipcik (2015). "The ubiquitin proteasome system as a potential therapeutic target for treatment of neurodegenerative diseases." *Gen Physiol Biophys* 34(4): 337-352.
- Ortiz, D. F., M. V. St Pierre, A. Abdulmessih and I. M. Arias (1997). "A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport." *J Biol Chem* 272(24): 15358-15365.
- Oshima, R., T. Hasegawa, K. Tamai, N. Sugeno, S. Yoshida, J. Kobayashi, A. Kikuchi, T. Baba, A. Futatsugi, I. Sato, K. Satoh, A. Takeda, M. Aoki and N. Tanaka (2016). "ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways." *Sci Rep* 6: 24997.
- Ostrowicz, C. W., C. T. Meiringer and C. Ungermann (2008). "Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics." *Autophagy* 4(1): 5-19.
- Ou, S. H., F. Wu, D. Harrich, L. F. Garcia-Martinez and R. B. Gaynor (1995). "Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs." *J Virol* 69(6): 3584-3596.
- Ozkaynak, E., D. Finley D, M. J. Solomon and A. Varshavsky (1987). "The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions." *EMBO J* 6(5):1429-39.
- Pandey, U. B., Z. Nie, Y. Batlevi, B. A. McCray, G. P. Ritson, N. B. Nedelsky, S. L. Schwartz, N. A. DiProspero, M. A. Knight, O. Schuldiner, R. Padmanabhan, M. Hild, D. L. Berry, D. Garza, C. C. Hubbert, T. P. Yao, E. H. Baehrecke and J. P. Taylor (2007). "HDAC6

rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS." *Nature* 447(7146): 859-863.

Papinski, D., M. Schuschnig, W. Reiter, L. Wilhelm, C. A. Barnes, A. Maiolica, I. Hansmann, T. Pfaffenwimmer, M. Kijanska, I. Stoffel, S. S. Lee, A. Brezovich, J. H. Lou, B. E. Turk, R. Aebersold, G. Ammerer, M. Peter and C. Kraft (2014). "Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase." *Mol Cell* 53(3): 471-483.

Parkinson, N., P. G. Ince, M. O. Smith, R. Highley, G. Skibinski, P. M. Andersen, K. E. Morrison, H. S. Pall, O. Hardiman, J. Collinge, P. J. Shaw, E. M. Fisher, M. R. C. P. i. A. Study and F. R. Consortium (2006). "ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)." *Neurology* 67(6): 1074-1077.

Pesiridis, G. S., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2009). "Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis." *Hum Mol Genet* 18(R2): R156-162.

Plotegher, N. and M. R. Duchen (2017). "Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Lysosomal Storage Disorders." *Trends Mol Med* 23(2): 116-134.

Polymenidou, M. and D. W. Cleveland (2011). "The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS." *Cell* 147(3): 498-508.

Polymenidou, M., C. Lagier-Tourenne, K. R. Hutt, S. C. Huelga, J. Moran, T. Y. Liang, S. C. Ling, E. Sun, E. Wancewicz, C. Mazur, H. Kordasiewicz, Y. Sedaghat, J. P. Donohue, L. Shiue, C. F. Bennett, G. W. Yeo and D. W. Cleveland (2011). "Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43." *Nat Neurosci* 14(4): 459-468.

Prasad, A., G. Raju, V. Sivalingam, A. Girdhar, M. Verma, A. Vats, V. Taneja, G. Prabusankar and B. K. Patel (2016). "An acridine derivative, [4,5-bis{(N-carboxy methyl imidazolium)methyl}acridine] dibromide, shows anti-TDP-43 aggregation effect in ALS disease models." *Sci Rep* 6: 39490.

Prosser, D. C., A. E. Pannunzio, J. L. Brodsky, J. Thorner, B. Wendland and A. F. O'Donnell (2015). "alpha-Arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis." *J Cell Sci* 128(22): 4220-4234.

Prpar Mihevc, S., S. Darovic, A. Kovanda, A. Bajc Cesnik, V. Zupunski and B. Rogelj (2017). "Nuclear trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration." *Brain* 140(Pt 1): 13-26.

Qiu, Q. S. and R. A. Fratti (2010). "The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1p regulates the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuole fusion." *J Cell Sci* 123(Pt 19): 3266-3275.

Ragusa, M. J., R. E. Stanley and J. H. Hurley (2012). "Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis." *Cell* 151(7): 1501-1512.

- Raniga, P. V., G. D. Trapani and K. F. Tonissen (2014). "Cross Talk between Two Antioxidant Systems, Thioredoxin and DJ-1: Consequences for Cancer." *Oncoscience* 1(1): 95-110.
- Ratti, A. and E. Buratti (2016). "Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins." *J Neurochem* 138 Suppl 1: 95-111.
- Reggiori, F. and D. J. Klionsky (2013). "Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation." *Genetics* 194(2): 341-361.
- Reggiori, F., I. Monastyrska, T. Shintani and D. J. Klionsky (2005). "The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 16(12): 5843-5856.
- Riezman, H. (1985). "Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis." *Cell* 40(4): 1001-1009.
- Riezman, H., A. Munn, M. I. Geli and L. Hicke (1996). "Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis." *Experientia* 52(12): 1033-1041.
- Ritz, D., M. Vuk, P. Kirchner, M. Bug, S. Schutz, A. Hayer, S. Bremer, C. Lusk, R. H. Baloh, H. Lee, T. Glatter, M. Gstaiger, R. Aebersold, C. C. Wehl and H. Meyer (2011). "Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations." *Nat Cell Biol* 13(9): 1116-1123.
- Romano, G., R. Klima, E. Buratti, P. Verstreken, F. E. Baralle and F. Feiguin (2014). "Chronological requirements of TDP-43 function in synaptic organization and locomotive control." *Neurobiol Dis* 71: 95-109.
- Romisch, K. (2006). "Cdc48p is UBX-linked to ER ubiquitin ligases." *Trends Biochem Sci* 31(1): 24-25.
- Rothman, J. H., I. Howald and T. H. Stevens (1989). "Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* 8(7): 2057-2065.
- Rowland, L. P. and N. A. Shneider (2001). "Amyotrophic lateral sclerosis." *N Engl J Med* 344(22): 1688-1700.
- Rumpf, S. and S. Jentsch (2006). "Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone." *Mol Cell* 21(2): 261-269.
- Rusten, T. E. and H. Stenmark (2009). "How do ESCRT proteins control autophagy?" *J Cell Sci* 122(Pt 13): 2179-2183.
- Rusten, T. E., T. Vaccari, K. Lindmo, L. M. Rodahl, I. P. Nezis, C. Sem-Jacobsen, F. Wendler, J. P. Vincent, A. Brech, D. Bilder and H. Stenmark (2007). "ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy." *Curr Biol* 17(20): 1817-1825.

- Sahu, R., S. Kaushik, C. C. Clement, E. S. Cannizzo, B. Scharf, A. Follenzi, I. Potolicchio, E. Nieves, A. M. Cuervo and L. Santambrogio (2011). "Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes." *Dev Cell* 20(1): 131-139.
- Saksena, S. and S. D. Emr (2009). "ESCRTs and human disease." *Biochem Soc Trans* 37(Pt 1): 167-172.
- Sala, G., D. Marinig, A. Arosio and C. Ferrarese (2016). "Role of Chaperone-Mediated Autophagy Dysfunctions in the Pathogenesis of Parkinson's Disease." *Front Mol Neurosci* 9: 157.
- Sarto-Jackson, I. and L. Tomaska (2016). "How to bake a brain: yeast as a model neuron." *Curr Genet* 62(2): 347-370.
- Sasser, T., Q. S. Qiu, S. Karunakaran, M. Padolina, A. Reyes, B. Flood, S. Smith, C. Gonzales and R. A. Fratti (2012A). "Yeast lipin 1 orthologue pah1p regulates vacuole homeostasis and membrane fusion." *J Biol Chem* 287(3): 2221-2236.
- Sasser, T. L., M. Padolina and R. A. Fratti (2012B). "The yeast vacuolar ABC transporter Ybt1p regulates membrane fusion through Ca<sup>2+</sup> transport modulation." *Biochem J* 448(3): 365-372.
- Schmidt, O. and D. Teis (2012). "The ESCRT machinery." *Curr Biol* 22(4): R116-120.
- Schreij, A. M., E. A. Fon and P. S. McPherson (2016). "Endocytic membrane trafficking and neurodegenerative disease." *Cell Mol Life Sci* 73(8): 1529-1545.
- Schütz, W. F.-W., M.; Macek B. (2010). "SILAC in Mikroorganismen." *BIOspektrum* 16. Jahrgang: 552-554.
- Schwenk, B. M., H. Hartmann, A. Serdaroglu, M. H. Schludi, D. Hornburg, F. Meissner, D. Orozco, A. Colombo, S. Tahirovic, M. Michaelsen, F. Schreiber, S. Haupt, M. Peitz, O. Brustle, C. Kupper, T. Klopstock, M. Otto, A. C. Ludolph, T. Arzberger, P. H. Kuhn and D. Edbauer (2016). "TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons." *EMBO J* 35(21): 2350-2370.
- Scotter, E. L., C. Vance, A. L. Nishimura, Y. B. Lee, H. J. Chen, H. Urwin, V. Sardone, J. C. Mitchell, B. Rogelj, D. C. Rubinsztein and C. E. Shaw (2014). "Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species." *J Cell Sci* 127(Pt 6): 1263-1278.
- Seeley, E. S., M. Kato, N. Margolis, W. Wickner and G. Eitzen (2002). "Genomic analysis of homotypic vacuole fusion." *Mol Biol Cell* 13(3): 782-794.
- Sephton, C. F., C. Cenik, A. Kucukural, E. B. Dammer, B. Cenik, Y. Han, C. M. Dewey, F. P. Roth, J. Herz, J. Peng, M. J. Moore and G. Yu (2011). "Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes." *J Biol Chem* 286(2): 1204-1215.

- Sephton, C. F., S. K. Good, S. Atkin, C. M. Dewey, P. Mayer, 3rd, J. Herz and G. Yu (2010). "TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development." *J Biol Chem* 285(9): 6826-6834.
- Sevlever, D., P. Jiang and S. H. Yen (2008). "Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species." *Biochemistry* 47(36): 9678-9687.
- Seyfried, N. T., Y. M. Gozal, E. B. Dammer, Q. Xia, D. M. Duong, D. Cheng, J. J. Lah, A. I. Levey and J. Peng (2010). "Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains." *Mol Cell Proteomics* 9(4): 705-718.
- Shan, X., P. M. Chiang, D. L. Price and P. C. Wong (2010). "Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(37): 16325-16330.
- Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." *Methods Enzymol* 350: 3-41.
- Shintani, T. and D. J. Klionsky (2004). "Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway." *J Biol Chem* 279(29): 29889-29894.
- Sibirny, A. A. (2016). "Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities." *FEMS Yeast Res* 16(4).
- Skibinski, G., N. J. Parkinson, J. M. Brown, L. Chakrabarti, S. L. Lloyd, H. Hummerich, J. E. Nielsen, J. R. Hodges, M. G. Spillantini, T. Thusgaard, S. Brandner, A. Brun, M. N. Rossor, A. Gade, P. Johannsen, S. A. Sorensen, S. Gydesen, E. M. Fisher and J. Collinge (2005). "Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia." *Nat Genet* 37(8): 806-808.
- Skoneczna, A., A. Micialkiewicz and M. Skoneczny (2007). "Saccharomyces cerevisiae Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species." *Free Radic Biol Med* 42(9): 1409-1420.
- Smith, J. J., M. Marelli, R. H. Christmas, F. J. Vizeacoumar, D. J. Dilworth, T. Ideker, T. Galitski, K. Dimitrov, R. A. Rachubinski and J. D. Aitchison (2002). "Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function." *J Cell Biol* 158(2): 259-271.
- Soo, K. Y., M. Halloran, V. Sundaramoorthy, S. Parakh, R. P. Toth, K. A. Southam, C. A. McLean, P. Lock, A. King, M. A. Farg and J. D. Atkin (2015). "Rab1-dependent ER-Golgi transport dysfunction is a common pathogenic mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-associated ALS." *Acta Neuropathol* 130(5): 679-697.
- Sreedharan, J., I. P. Blair, V. B. Tripathi, X. Hu, C. Vance, B. Rogelj, S. Ackerley, J. C. Durnall, K. L. Williams, E. Buratti, F. Baralle, J. de Belleruche, J. D. Mitchell, P. N. Leigh, A. Al-Chalabi, C. C. Miller, G. Nicholson and C. E. Shaw (2008). "TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Science* 319(5870): 1668-1672.

- Stapleton, M. P. (1997). "Sir James Black and propranolol. The role of the basic sciences in the history of cardiovascular pharmacology." *Tex Heart Inst J* 24(4): 336-342.
- Stauffer, B. and T. Powers (2015). "Target of rapamycin signaling mediates vacuolar fission caused by endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 26(25): 4618-4630.
- Stawiecka-Mirota, M., W. Pokrzywa, J. Morvan, T. Zoladek, R. Haguenaer-Tsapis, D. Urban-Grimal and P. Morsomme (2007). "Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation." *Traffic* 8(9): 1280-1296.
- Stewart, W. W. (1978). "Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer." *Cell* 14(3): 741-759.
- Stewart, W. W. (1981). "Lucifer dyes--highly fluorescent dyes for biological tracing." *Nature* 292(5818): 17-21.
- Sugeno, N., T. Hasegawa, N. Tanaka, M. Fukuda, K. Wakabayashi, R. Oshima, M. Konno, E. Miura, A. Kikuchi, T. Baba, T. Anan, M. Nakao, S. Geisler, M. Aoki and A. Takeda (2014). "Lys-63-linked ubiquitination by E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 facilitates endosomal sequestration of internalized alpha-synuclein." *J Biol Chem* 289(26): 18137-18151.
- Sundaramoorthy, V., J. M. Sultana and J. D. Atkin (2015). "Golgi fragmentation in amyotrophic lateral sclerosis, an overview of possible triggers and consequences." *Front Neurosci* 9: 400.
- Suzuki, K., M. Akioka, C. Kondo-Kakuta, H. Yamamoto and Y. Ohsumi (2013). "Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* 126(Pt 11): 2534-2544.
- Suzuki, S. W., H. Yamamoto, Y. Oikawa, C. Kondo-Kakuta, Y. Kimura, H. Hirano and Y. Ohsumi (2015). "Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(11): 3350-3355.
- Tai, H. C. and E. M. Schuman (2008). "Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction." *Nat Rev Neurosci* 9(11): 826-838.
- Takahashi, R. H., T. A. Milner, F. Li, E. E. Nam, M. A. Edgar, H. Yamaguchi, M. F. Beal, H. Xu, P. Greengard and G. K. Gouras (2002). "Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology." *Am J Pathol* 161(5): 1869-1879.
- Tam, Y. Y., J. C. Torres-Guzman, F. J. Vizeacoumar, J. J. Smith, M. Marelli, J. D. Aitchison and R. A. Rachubinski (2003). "Pex11-related proteins in peroxisome dynamics: a role for the novel peroxin Pex27p in controlling peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 14(10): 4089-4102.

- Tardiff, D. F., N. T. Jui, V. Khurana, M. A. Tambe, M. L. Thompson, C. Y. Chung, H. B. Kamadurai, H. T. Kim, A. K. Lancaster, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, J. C. Rochet, S. L. Buchwald and S. Lindquist (2013). "Yeast reveal a "druggable" Rsp5/Nedd4 network that ameliorates alpha-synuclein toxicity in neurons." *Science* 342(6161): 979-983.
- Taylor, J. P., R. H. Brown, Jr. and D. W. Cleveland (2016). "Decoding ALS: from genes to mechanism." *Nature* 539(7628): 197-206.
- Tenreiro, S., M. C. Munder, S. Alberti and T. F. Outeiro (2013). "Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration." *J Neurochem* 127(4): 438-452.
- Tofaris, G. K., H. T. Kim, R. Houriez, J. W. Jung, K. P. Kim and A. L. Goldberg (2011). "Ubiquitin ligase Nedd4 promotes alpha-synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(41): 17004-17009.
- Tollervey, J. R., T. Curk, B. Rogelj, M. Briese, M. Cereda, M. Kayikci, J. Konig, T. Hortobagyi, A. L. Nishimura, V. Zupunski, R. Patani, S. Chandran, G. Rot, B. Zupan, C. E. Shaw and J. Ule (2011). "Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43." *Nat Neurosci* 14(4): 452-458.
- Tong, J., C. Huang, F. Bi, Q. Wu, B. Huang and H. Zhou (2012). "XBP1 depletion precedes ubiquitin aggregation and Golgi fragmentation in TDP-43 transgenic rats." *J Neurochem* 123(3): 406-416.
- Toret, C. P. and D. G. Drubin (2006). "The budding yeast endocytic pathway." *J Cell Sci* 119(Pt 22): 4585-4587.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 333(1-2): 169-174.
- Turner, M. R., O. Hardiman, M. Benatar, B. R. Brooks, A. Chio, M. de Carvalho, P. G. Ince, C. Lin, R. G. Miller, H. Mitsumoto, G. Nicholson, J. Ravits, P. J. Shaw, M. Swash, K. Talbot, B. J. Traynor, L. H. Van den Berg, J. H. Veldink, S. Vucic and M. C. Kiernan (2013). "Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet Neurol* 12(3): 310-322.
- Udan-Johns, M., R. Bengoechea, S. Bell, J. Shao, M. I. Diamond, H. L. True, C. C. Weihl and R. H. Baloh (2013). "Prion-like nuclear aggregation of TDP-43 during heat shock is regulated by HSP40/70 chaperones." *Hum Mol Genet* 23(1): 157-170.
- Urushitani, M., T. Sato, H. Bamba, Y. Hisa and I. Tooyama (2010). "Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of polyubiquitinated TDP-43." *J Neurosci Res* 88(4): 784-797.
- Urwin, H., A. Authier, J. E. Nielsen, D. Metcalf, C. Powell, K. Froud, D. S. Malcolm, I. Holm, P. Johannsen, J. Brown, E. M. Fisher, J. van der Zee, M. Bruyland, F. R. Consortium, C. Van Broeckhoven, J. Collinge, S. Brandner, C. Fütter and A. M. Isaacs (2010). "Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations." *Hum Mol Genet* 19(11): 2228-2238.

- van Eersel, J., Y. D. Ke, A. Gladbach, M. Bi, J. Gotz, J. J. Kril and L. M. Ittner (2011). "Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons." *PLoS One* 6(7): e22850.
- Vande Velde, C., K. K. McDonald, Y. Boukhedimi, M. McAlonis-Downes, C. S. Lobsiger, S. Bel Hadj, A. Zandona, J. P. Julien, S. B. Shah and D. W. Cleveland (2011). "Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset." *PLoS One* 6(7): e22031.
- Wang, C. W., P. E. Stromhaug, J. Shima and D. J. Klionsky (2002). "The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways." *J Biol Chem* 277(49): 47917-47927.
- Wang, I. F., B. S. Guo, Y. C. Liu, C. C. Wu, C. H. Yang, K. J. Tsai and C. K. Shen (2012). "Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(37): 15024-15029.
- Wang, S., G. Thibault and D. T. Ng (2011). "Routing misfolded proteins through the multivesicular body (MVB) pathway protects against proteotoxicity." *J Biol Chem* 286(33): 29376-29387.
- Wang, W., L. Li, W. L. Lin, D. W. Dickson, L. Petrucelli, T. Zhang and X. Wang (2013). "The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons." *Hum Mol Genet* 22(23): 4706-4719.
- Wang, W., L. Wang, J. Lu, S. L. Siedlak, H. Fujioka, J. Liang, S. Jiang, X. Ma, Z. Jiang, E. L. da Rocha, M. Sheng, H. Choi, P. H. Lerou, H. Li, X. Wang (2016). "The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity." *Nat Med* 22(8): 869-78.
- Wang, X., H. Fan, Z. Ying, B. Li, H. Wang and G. Wang (2010). "Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system." *Neurosci Lett* 469(1): 112-116.
- Wang, X., M. Ma, J. Teng, X. Che, W. Zhang, S. Feng, S. Zhou, Y. Zhang, E. Wu and X. Ding (2015A). "Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy." *Int J Biol Sci* 11(7): 752-761.
- Wang, X., S. Zhou, X. Ding, M. Ma, J. Zhang, Y. Zhou, E. Wu and J. Teng (2015B). "Activation of ER Stress and Autophagy Induced by TDP-43 A315T as Pathogenic Mechanism and the Corresponding Histological Changes in Skin as Potential Biomarker for ALS with the Mutation." *Int J Biol Sci* 11(10): 1140-1149.
- Wang, Z., W. A. Wilson, M. A. Fujino and P. J. Roach (2001). "Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p." *Mol Cell Biol* 21(17): 5742-5752.

- Warraich, S. T., S. Yang, G. A. Nicholson and I. P. Blair (2010). "TDP-43: a DNA and RNA binding protein with roles in neurodegenerative diseases." *Int J Biochem Cell Biol* 42(10): 1606-1609.
- Watabe, K., K. Akiyama, E. Kawakami, T. Ishii, K. Endo, H. Yanagisawa, K. Sango and M. Tsukamoto (2014). "Adenoviral expression of TDP-43 and FUS genes and shRNAs for protein degradation pathways in rodent motoneurons in vitro and in vivo." *Neuropathology* 34(1): 83-98.
- Watanabe, Y., T. Kobayashi, H. Yamamoto, H. Hoshida, R. Akada, F. Inagaki, Y. Ohsumi and N. N. Noda (2012). "Structure-based analyses reveal distinct binding sites for Atg2 and phosphoinositides in Atg18." *J Biol Chem* 287(38): 31681-31690.
- Webber, J. L. and S. A. Tooze (2010). "New insights into the function of Atg9." *FEBS Lett* 584(7): 1319-1326.
- Wegorzewska, I., S. Bell, N. J. Cairns, T. M. Miller and R. H. Baloh (2009). "TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(44): 18809-18814.
- Weinberg, J. and D. G. Drubin (2012). "Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast." *Trends Cell Biol* 22(1): 1-13.
- Wen, X. and D. J. Klionsky (2016). "An overview of macroautophagy in yeast." *J Mol Biol* 428(9 Pt A): 1681-1699.
- Wendland, B., S. D. Emr and H. Riezman (1998). "Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways." *Curr Opin Cell Biol* 10(4): 513-522.
- Wickner, W. (2002). "Yeast vacuoles and membrane fusion pathways." *EMBO J* 21(6): 1241-1247.
- Wijayanti, I., D. Watanabe, S. Oshiro and H. Takagi (2015). "Isolation and functional analysis of yeast ubiquitin ligase Rsp5 variants that alleviate the toxicity of human alpha-synuclein." *J Biochem* 157(4): 251-260.
- Williams, R. L. and S. Urbé (2007). "The emerging shape of the ESCRT machinery." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 355-368.
- Wilson, M. A., C. V. St Amour, J. L. Collins, D. Ringe and G. A. Petsko (2004). "The 1.8-Å resolution crystal structure of YDR533Cp from *Saccharomyces cerevisiae*: a member of the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6): 1531-1536.
- Winter, S., and Ludolph A.C. (2004). "Motoneuronenerkrankungen (in German). Neurodegenerative Erkrankungen des Alters (ISBN 3131380810)." Georg Thieme Verlag.
- Woerner, A. C., F. Frottin, D. Hornburg, L. R. Feng, F. Meissner, M. Patra, J. Tatzelt, M. Mann, K. F. Winklhofer, F. U. Hartl and M. S. Hipp (2016). "Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA." *Science* 351(6269): 173-176.

- Wong, E. and A. M. Cuervo (2010). "Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases." *Nat Neurosci* 13(7): 805-811.
- Wong, Y. C. and E. L. Holzbaur (2015). "Autophagosome dynamics in neurodegeneration at a glance." *J Cell Sci* 128(7): 1259-1267.
- Wood, L. B., Winslow, A.R., and Strasser, S.D. (2015). "Systems biology of neurodegenerative diseases." *Integrative biology (Camb)* 7(7): 758-75.
- Woolford, C. A., L. B. Daniels, F. J. Park, E. W. Jones, J. N. Van Arsdell and M. A. Innis (1986). "The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases." *Mol Cell Biol* 6(7): 2500-2510.
- Xia, Q., H. Wang, Z. Hao, C. Fu, Q. Hu, F. Gao, H. Ren, D. Chen, J. Han, Z. Ying and G. Wang (2015). "TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion." *EMBO J* 35(2): 121-142.
- Xie, Z., U. Nair and D. J. Klionsky (2008). "Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation." *Mol Biol Cell* 19(8): 3290-3298.
- Xu, T., V. Pagadala and D. M. Mueller (2015). "Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase." *Microb Cell* 2(4): 105-125.
- Yang, Y., M. Coleman, L. Zhang, X. Zheng and Z. Yue (2013). "Autophagy in axonal and dendritic degeneration." *Trends Neurosci* 36(7): 418-428.
- Yang, Z., J. Geng, W. L. Yen, K. Wang and D. J. Klionsky (2010). "Positive or negative roles of different cyclin-dependent kinase Pho85-cyclin complexes orchestrate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell* 38(2): 250-264.
- Yen, W. L., J. E. Legakis, U. Nair and D. J. Klionsky (2007). "Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9." *Mol Biol Cell* 18(2): 581-593.
- Zappavigna, S. L., A.; Vitale, G.; Merola, N.; Facchini, S.; Caraglia, M. (2013). "Autophagic cell death: A new frontier in cancer research." *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4: 250-262.
- Ždravlević, M., N. Guaragnella, L. Antonacci, E. Marra and S. Giannattasio (2012). "Yeast as a tool to study signaling pathways in mitochondrial stress response and cytoprotection." *ScientificWorldJournal* 2012: 912147.
- Zhang, L., R. Sheng and Z. Qin (2009). "The lysosome and neurodegenerative diseases." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41(6): 437-445.
- Zhang, Y. J., T. F. Gendron, Y. F. Xu, L. W. Ko, S. H. Yen and L. Petrucelli (2010). "Phosphorylation regulates proteasomal-mediated degradation and solubility of TAR DNA binding protein-43 C-terminal fragments." *Mol Neurodegener* 5: 33.

Zhao, Y., J. A. Macgurn, M. Liu and S. Emr (2013). "The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress." *Elife* 2: e00459.



## 7 Anhang

**Tab. I: Zusammenfassung aller 109 untersuchten Deletionsstämme mit ihren Wachstumsindizes nach der TDP-43-Expression (3. Inkubationstag).** Aufgelistet sind alle Gene, deren Deletionsstämme im TDP-43-Tüpfeltestscreen untersucht wurden. Das Wachstum der TDP-43-exprimierenden Deletionsstämme wurde mit dem Wachstum des jeweiligen TDP-43-exprimierenden Wildtyps verglichen, wobei grün einen besseren, gelb einen ähnlichen und rot einen schlechteren Wuchs gegenüber dem Kontrollstamm signalisiert. Die Tabelle bezieht sich auf die Daten, welche in Abb. 10 gezeigt werden.

Genname	Index	Genname	Index	Genname	Index	Genname	Index
<i>SLG1</i>	1,485	<i>ATG24</i>	0,333	<i>ATG1</i>	-0,191	<i>CIT2</i>	-0,571
<i>ATG9</i>	1,000	<i>MPC3</i>	0,333	<i>ATG20</i>	-0,200	<i>VPS4</i>	-0,571
<i>HOG1</i>	1,000	<i>PEX27</i>	0,333	<i>ATG34</i>	-0,200	<i>MDM12</i>	-0,583
<i>SNX4</i>	1,000	<i>VPS21</i>	0,333	<i>ENT1</i>	-0,200	<i>MMM1</i>	-0,625
<i>POR1</i>	0,857	<i>ATG31</i>	0,250	<i>UBI4</i>	-0,214	<i>VPS23</i>	-0,625
<i>PBS2</i>	0,833	<i>ATG15</i>	0,244	<i>TOR1</i>	-0,250	<i>VPS41</i>	-0,625
<i>POR2</i>	0,833	<i>GAT1</i>	0,200	<i>ATG14</i>	-0,273	<i>YPT7</i>	-0,658
<i>RTG3</i>	0,833	<i>YBT1</i>	0,200	<i>ATG26</i>	-0,286	<i>VPS60</i>	-0,667
<i>VTA1</i>	0,833	<i>ATG21</i>	0,167	<i>MON1</i>	-0,286	<i>GEM1</i>	-0,682
<i>WHI2</i>	0,833	<i>MDM38</i>	0,167	<i>ATG29</i>	-0,333	<i>RPN4</i>	-0,732
<i>CIS1</i>	0,800	<i>SLT2</i>	0,167	<i>END3</i>	-0,333	<i>VAM3</i>	-0,743
<i>ATG41</i>	0,800	<i>YIL165C</i>	0,167	<i>ATG6</i>	-0,375	<i>PEX14</i>	-0,750
<i>ATG13</i>	0,750	<i>UTH1</i>	0,143	<i>PEX11</i>	-0,375	<i>ATG17</i>	-0,775
<i>ATG36</i>	0,665	<i>ATG2</i>	0,100	<i>PEX25</i>	-0,375	<i>CCZ1</i>	-0,800
<i>ACS1</i>	0,600	<i>BMH2</i>	0,099	<i>NHX1</i>	-0,389	<i>VPS24</i>	-0,869
<i>ATG23</i>	0,596	<i>ARK1</i>	0,000	<i>ATG11</i>	-0,400	<i>ATG7</i>	-0,900
<i>ATG32</i>	0,583	<i>ATG10</i>	0,000	<i>DLD3</i>	-0,400	<i>VAM7</i>	-0,900
<i>PTC6</i>	0,577	<i>ATG12</i>	0,000	<i>PEX13</i>	-0,400	<i>MPC2</i>	-1,000
<i>AIM26</i>	0,556	<i>ATG27</i>	0,000	<i>VPS27</i>	-0,416	<i>VPS28</i>	-1,125
<i>NPR1</i>	0,528	<i>ATG5</i>	0,000	<i>ADR1</i>	-0,429	<i>TCO89</i>	-1,126
<i>ATG22</i>	0,500	<i>ATG8</i>	0,000	<i>BMH1</i>	-0,429	<i>VAM6</i>	-1,333
<i>FMC1</i>	0,500	<i>VPS2</i>	0,000	<i>PEP4</i>	-0,448	<i>MDM34</i>	-1,500
<i>SPE1</i>	0,500	<i>ATG33</i>	-0,089	<i>ATG18</i>	-0,500	<i>VPS22</i>	-1,500
<i>YOR019W</i>	0,500	<i>PIP2</i>	-0,095	<i>OAF1</i>	-0,500	<i>MPC1</i>	-1,571
<i>PEX3</i>	0,481	<i>MDM10</i>	-0,111	<i>SLA1</i>	-0,500	<i>PHO85</i>	-2,231
<i>SIR2</i>	0,444	<i>DOA4</i>	-0,125	<i>YLL054C</i>	-0,500		
<i>ATG3</i>	0,400	<i>EDE1</i>	-0,143	<i>VPS25</i>	-0,511		
<i>VPS33</i>	0,375	<i>ATG16</i>	-0,167	<i>ATG19</i>	-0,571		

**Tab. II: Zusammenfassung aller 105 untersuchten Deletionsstämme mit ihren Wachstumsindizes nach der TDP-43-Expression (6. Inkubationstag).** Aufgelistet sind alle Gene, deren Deletionsstämme im TDP-43-Tüpfeltestscreen untersucht wurden. Das Wachstum der TDP-43-exprimierenden Deletionsstämme wurde mit dem Wachstum des jeweiligen TDP-43-exprimierenden Wildtyps verglichen, wobei grün einen besseren, gelb einen ähnlichen und rot einen schlechteren Wuchs gegenüber dem Kontrollstamm signalisiert. Die Tabelle bezieht sich auf die Daten, welche in Abb. 10 gezeigt werden.

Gename	Index	Gename	Index	Gename	Index	Gename	Index
<i>SLG1</i>	1,600	<i>VPS2</i>	0,417	<i>ENT1</i>	0,067	<i>MPC3</i>	-0,333
<i>PBS2</i>	1,333	<i>VPS23</i>	0,417	<i>BMH2</i>	0,043	<i>GEM1</i>	-0,333
<i>AIM26</i>	1,250	<i>DLD3</i>	0,400	<i>PEX13</i>	0,000	<i>ADR1</i>	-0,333
<i>HOG1</i>	1,222	<i>PEX27</i>	0,333	<i>VPS60</i>	0,000	<i>VPS41</i>	-0,333
<i>SNX4</i>	1,167	<i>YBT1</i>	0,333	<i>DOA4</i>	0,000	<i>ATG33</i>	-0,338
<i>ATG10</i>	1,000	<i>POR1</i>	0,286	<i>ARK1</i>	0,000	<i>MPC2</i>	-0,375
<i>ATG13</i>	1,000	<i>FMC1</i>	0,286	<i>END3</i>	0,000	<i>VPS28</i>	-0,400
<i>RTG3</i>	1,000	<i>ATG2</i>	0,263	<i>SLA1</i>	-0,083	<i>ATG5</i>	-0,429
<i>NPR1</i>	1,000	<i>ATG24</i>	0,250	<i>VAM7</i>	-0,083	<i>ATG29</i>	-0,500
<i>SIR2</i>	0,852	<i>WHI2</i>	0,250	<i>VPS22</i>	-0,095	<i>CIT2</i>	-0,500
<i>ATG3</i>	0,833	<i>TOR1</i>	0,206	<i>YOR019W</i>	-0,125	<i>VAM6</i>	-0,500
<i>ATG17</i>	0,833	<i>PTC6</i>	0,201	<i>BMH1</i>	-0,143	<i>PEX14</i>	-0,571
<i>VTA1</i>	0,833	<i>ATG20</i>	0,200	<i>PEX25</i>	-0,143	<i>VAM3</i>	-0,579
<i>ATG34</i>	0,800	<i>ATG41</i>	0,200	<i>MON1</i>	-0,143	<i>MMM1</i>	-0,600
<i>CIS1</i>	0,800	<i>ACS1</i>	0,200	<i>VPS27</i>	-0,152	<i>ATG7</i>	-0,600
<i>ATG9</i>	0,769	<i>PHO85</i>	0,200	<i>ATG6</i>	-0,167	<i>MDM34</i>	-0,600
<i>VPS21</i>	0,762	<i>OAF1</i>	0,200	<i>SLT2</i>	-0,200	<i>YLL054C</i>	-0,600
<i>UTH1</i>	0,714	<i>PEX3</i>	0,183	<i>VPS24</i>	-0,211	<i>YPT7</i>	-0,620
<i>SPE1</i>	0,667	<i>ATG21</i>	0,167	<i>ATG12</i>	-0,222	<i>PIP2</i>	-0,625
<i>ATG23</i>	0,667	<i>ATG27</i>	0,167	<i>VPS25</i>	-0,235	<i>ATG26</i>	-0,750
<i>ATG32</i>	0,600	<i>POR2</i>	0,167	<i>ATG16</i>	-0,250	<i>ATG31</i>	-0,800
<i>EDE1</i>	0,571	<i>VPS4</i>	0,167	<i>CCZ1</i>	-0,250	<i>TCO89</i>	-0,806
<i>ATG18</i>	0,500	<i>ATG15</i>	0,167	<i>ATG19</i>	-0,286	<i>MDM12</i>	-1,048
<i>ATG22</i>	0,500	<i>PEX11</i>	0,143	<i>PEP4</i>	-0,300	<i>ATG14</i>	-3,250
<i>YIL165C</i>	0,500	<i>ATG8</i>	0,111	<i>NHX1</i>	-0,313		
<i>VPS33</i>	0,500	<i>MDM10</i>	0,111	<i>MDM38</i>	-0,333		
<i>ATG36</i>	0,494	<i>ATG1</i>	0,079	<i>MPC1</i>	-0,333		

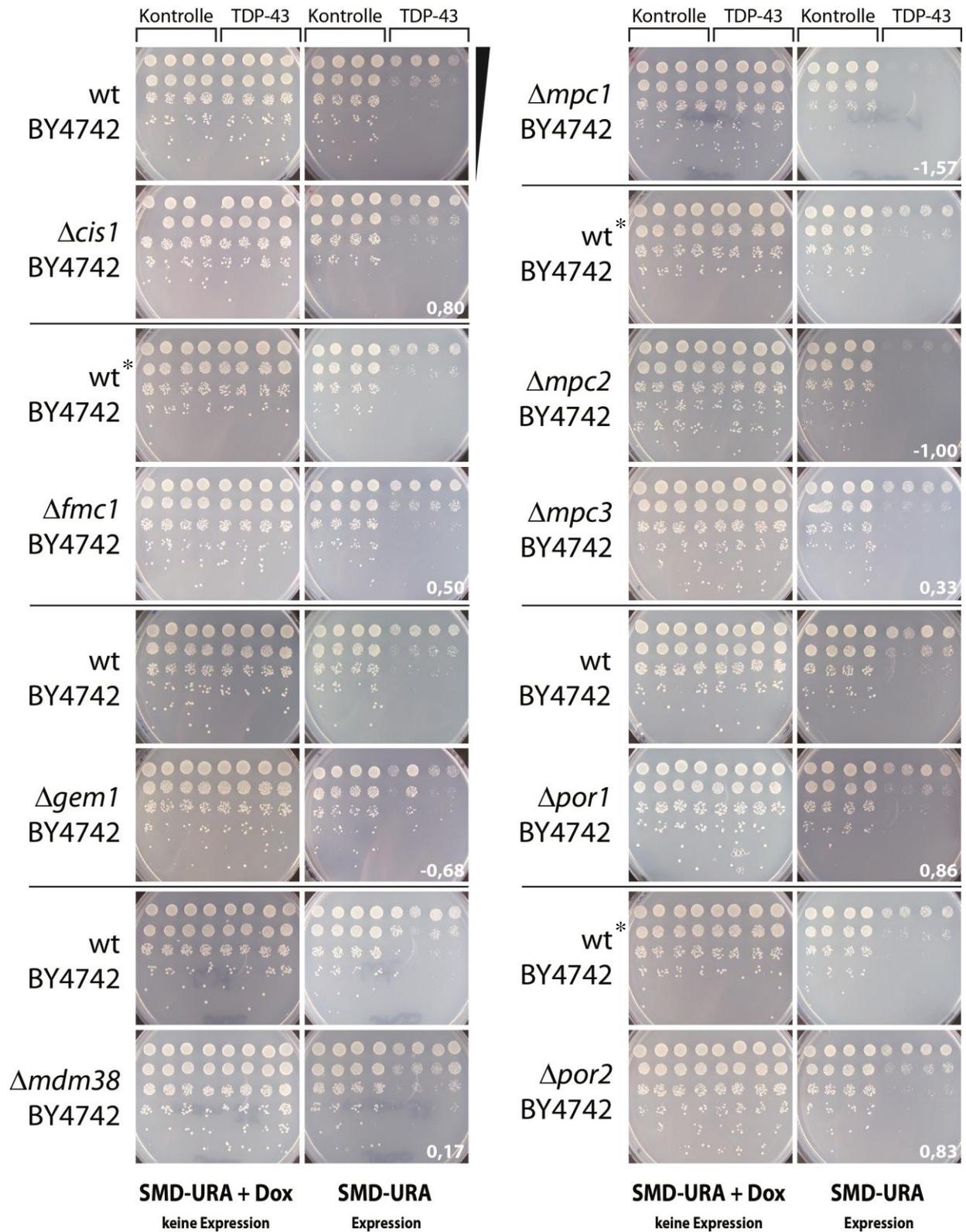
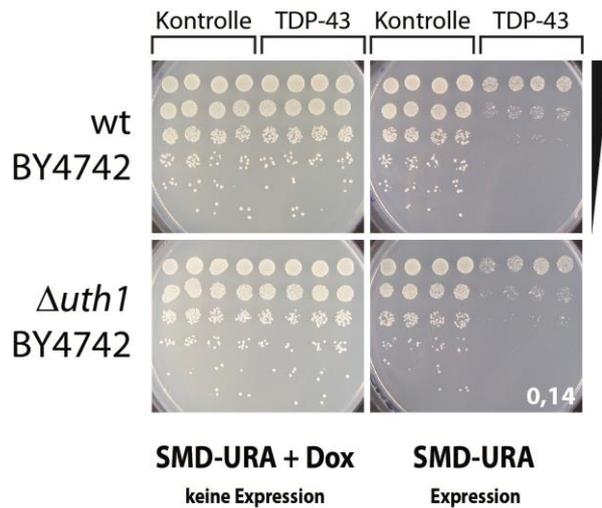
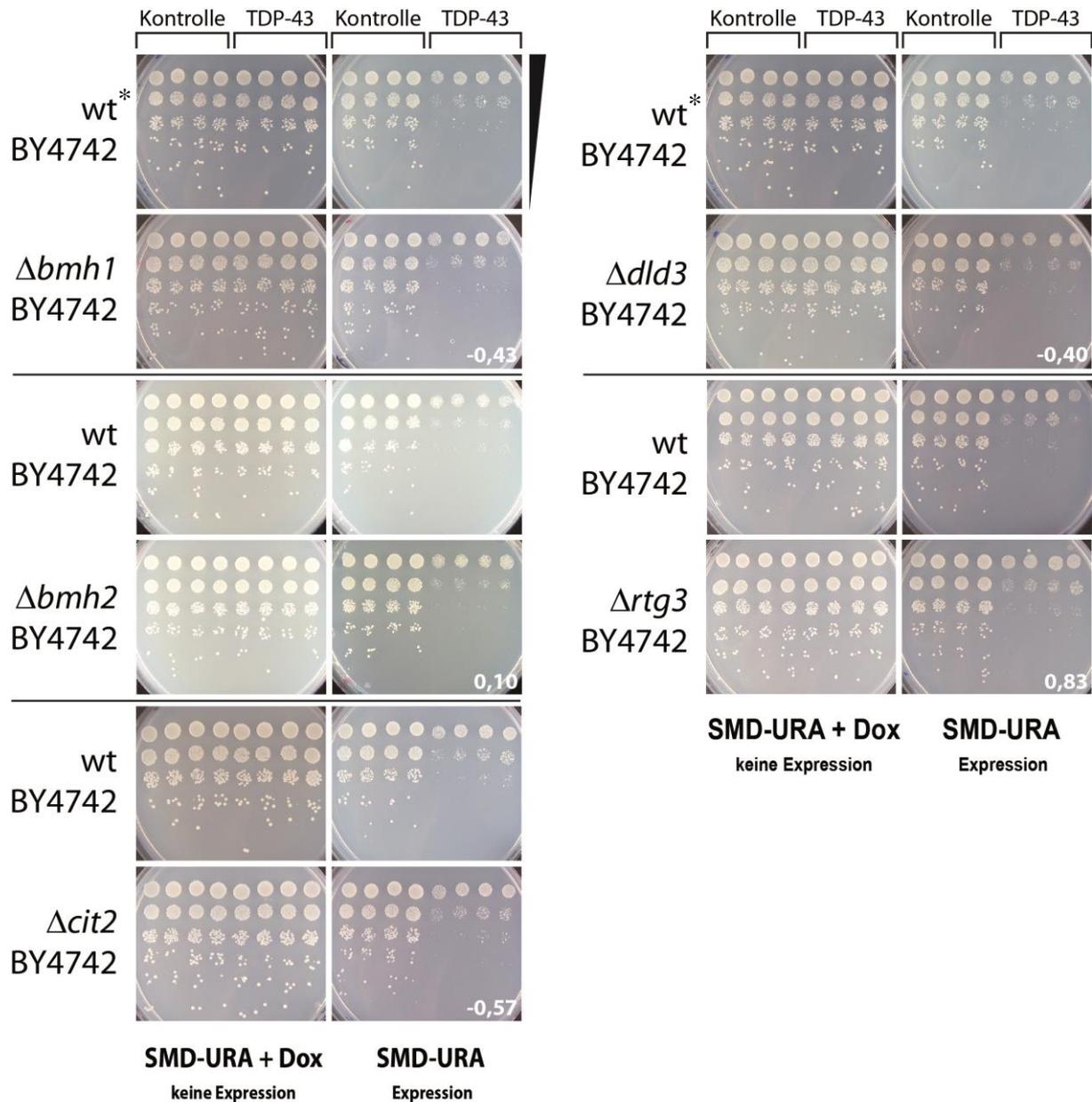


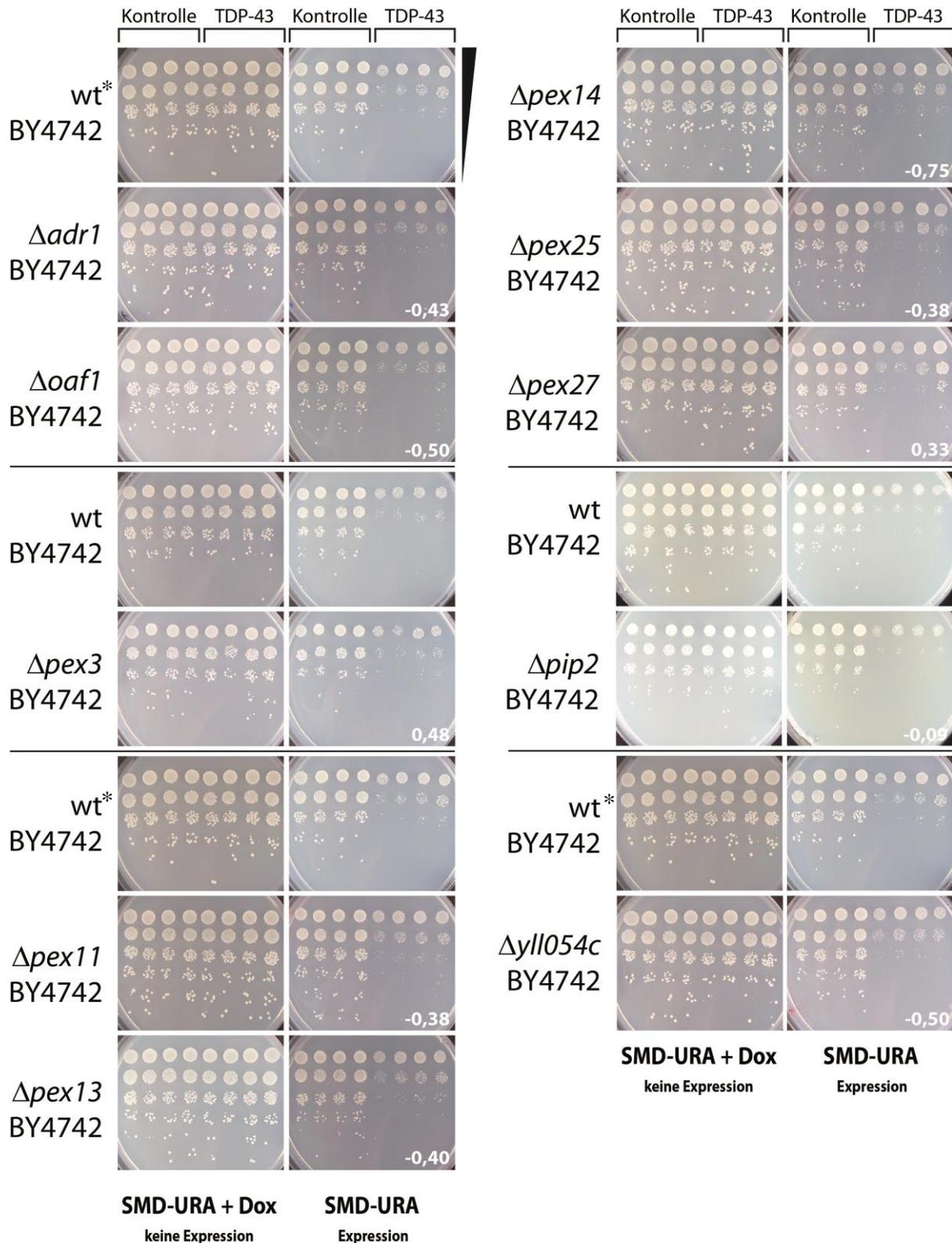
Abb. III: Abbildungsbeschreibung siehe Fortsetzung nächste Seite.



**Abb. III: Die Expression von TDP-43 verursacht ein Wachstumsdefizit beim wt und den Deletionsstämmen, denen Mitochondrien-assoziierte Gene fehlen.** Der Wildtyp und die deletierten Stämme wurden mit einem Doxycyclin-abhängigen Kontroll- oder TDP-43-codierenden Konstrukt transformiert. Anschließend erfolgten das Tüpfeln auf Expressions- und Nichtexpressionsplatten (SMD-Ura+/-Dox) und die Inkubation für drei Tage. Das Wuchsverhalten der 10 untersuchten Deletionsstämmen gegenüber dem wt umfasste ein breites Spektrum von stark reduziert bis verbessert (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden.



**Abb. IV: Die Expression von TDP-43 bedingt ein reduziertes Wachstum beim Wildtyp und den Deletionsstämmen, denen Gene für die retrograde Stressantwort fehlen.** Die fünf analysierten Deletionsstämmen zeigten gegenüber dem wt einen stark verbesserten bis verschlechterten Wuchs (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden.



**Abb. V:** Die Synthese von TDP-43 bewirkt ein Wachstumsdefizit beim wt und den Deletionsstämmen, denen Peroxisomen-assoziierte Gene fehlen. Das Wuchsverhalten der 10 Mutationstämmen gegenüber dem Wildtyp umfasste ein breites Spektrum von reduziert bis leicht verbessert (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden.

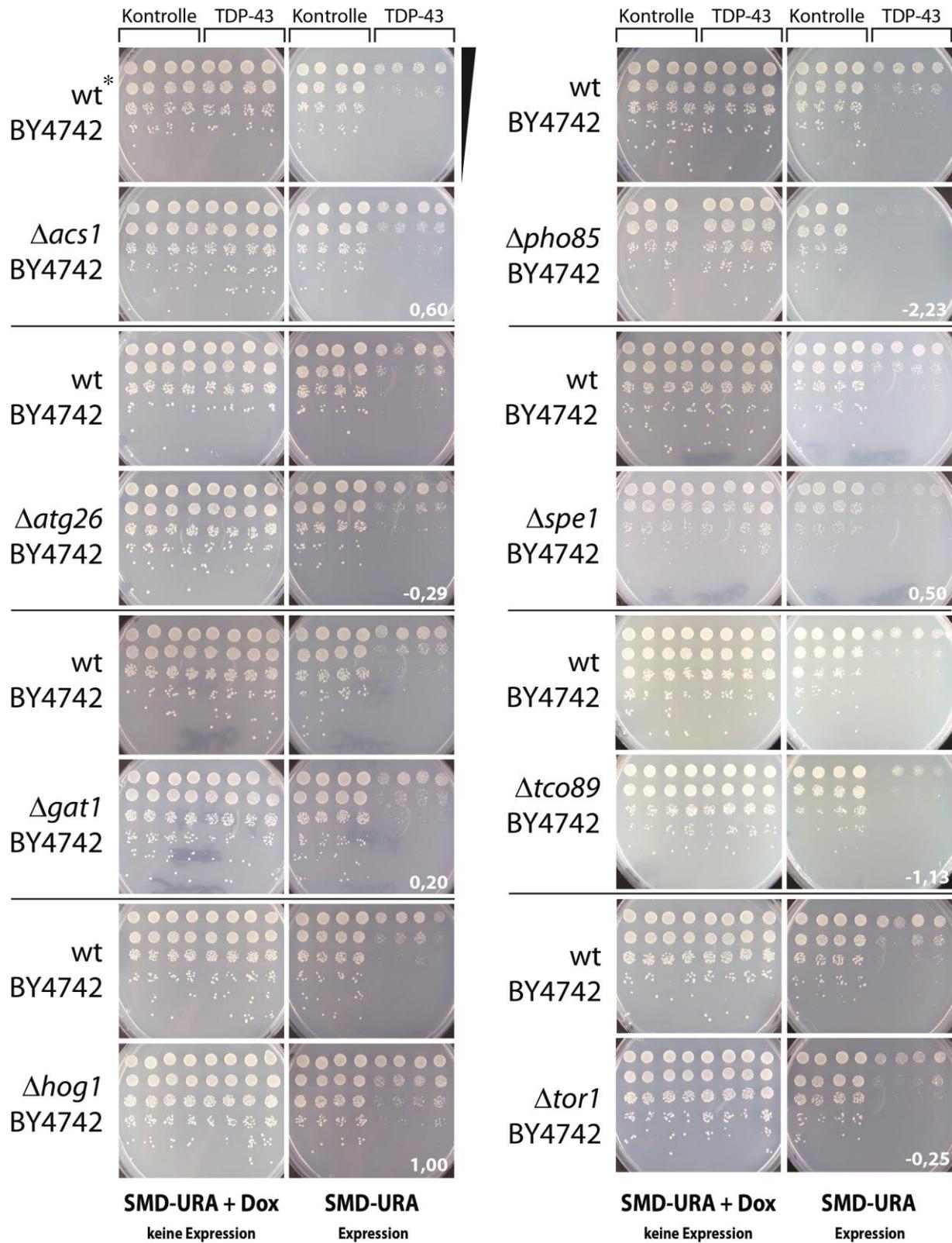
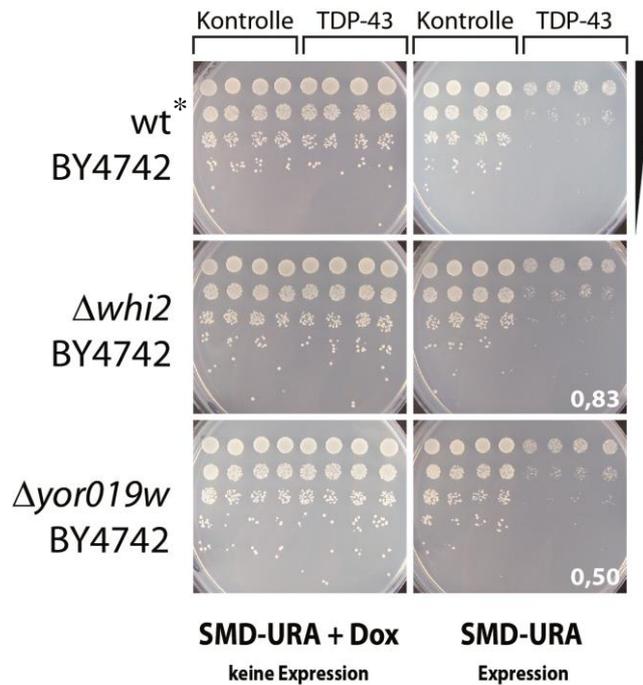


Abb. VI: Abbildungsbeschreibung siehe Fortsetzung nächste Seite.



**Abb. VI: Die TDP-43-Expression verursacht eine Wachstumsreduktion beim wt und bei Deletionsstämmen, denen „weitere Gene“ (codierten für multifunktionale Proteine, Proteine, die in vorhergehenden TDP-43-Screens aufgetreten waren oder eine noch unbekannt Funktion besaßen) fehlen.** Die 10 analysierten Deletionsstämmen waren in ihrem Wuchs im Vergleich zum Wildtyp während der Synthese von TDP-43 stark gehemmt bis stark verbessert (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden.



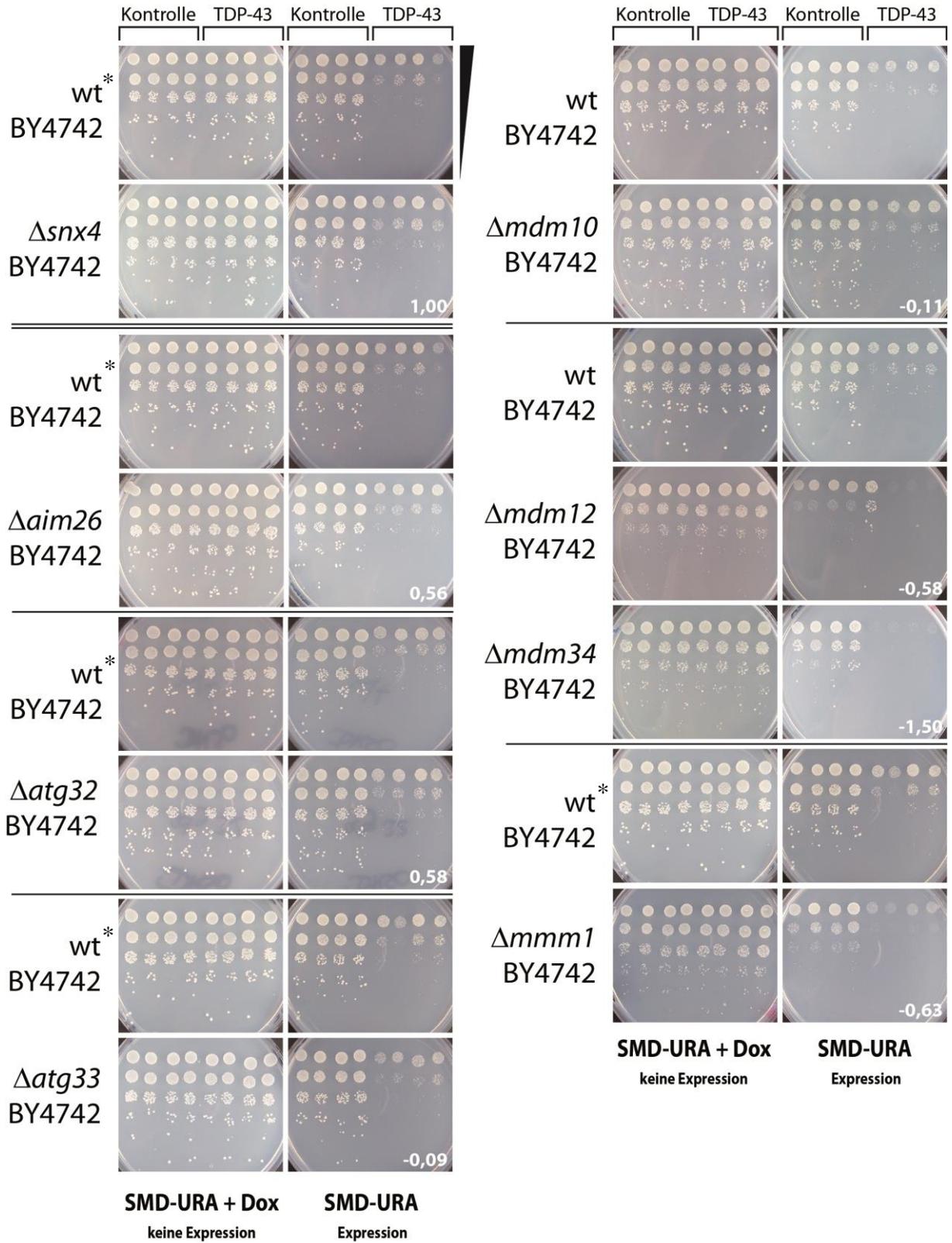
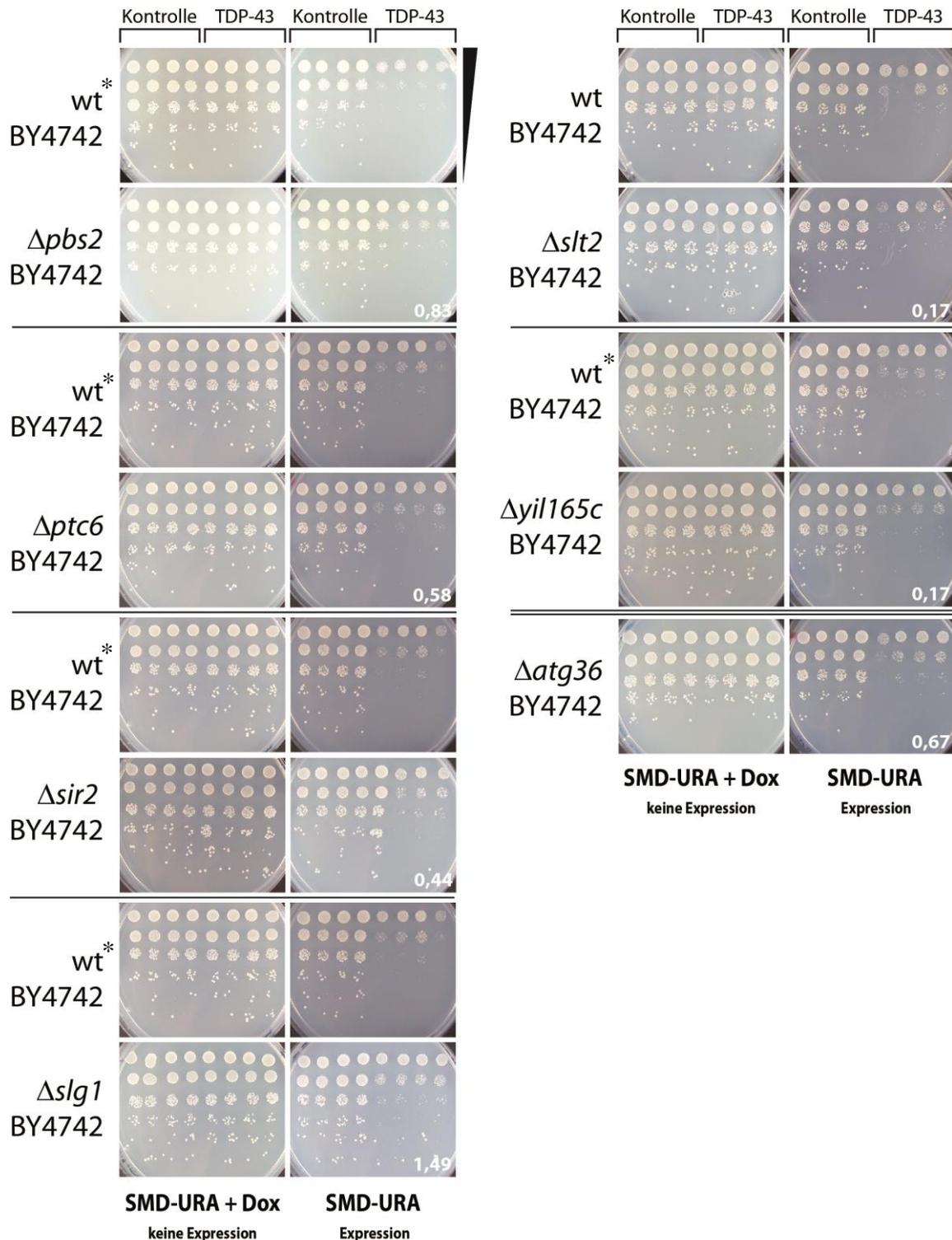
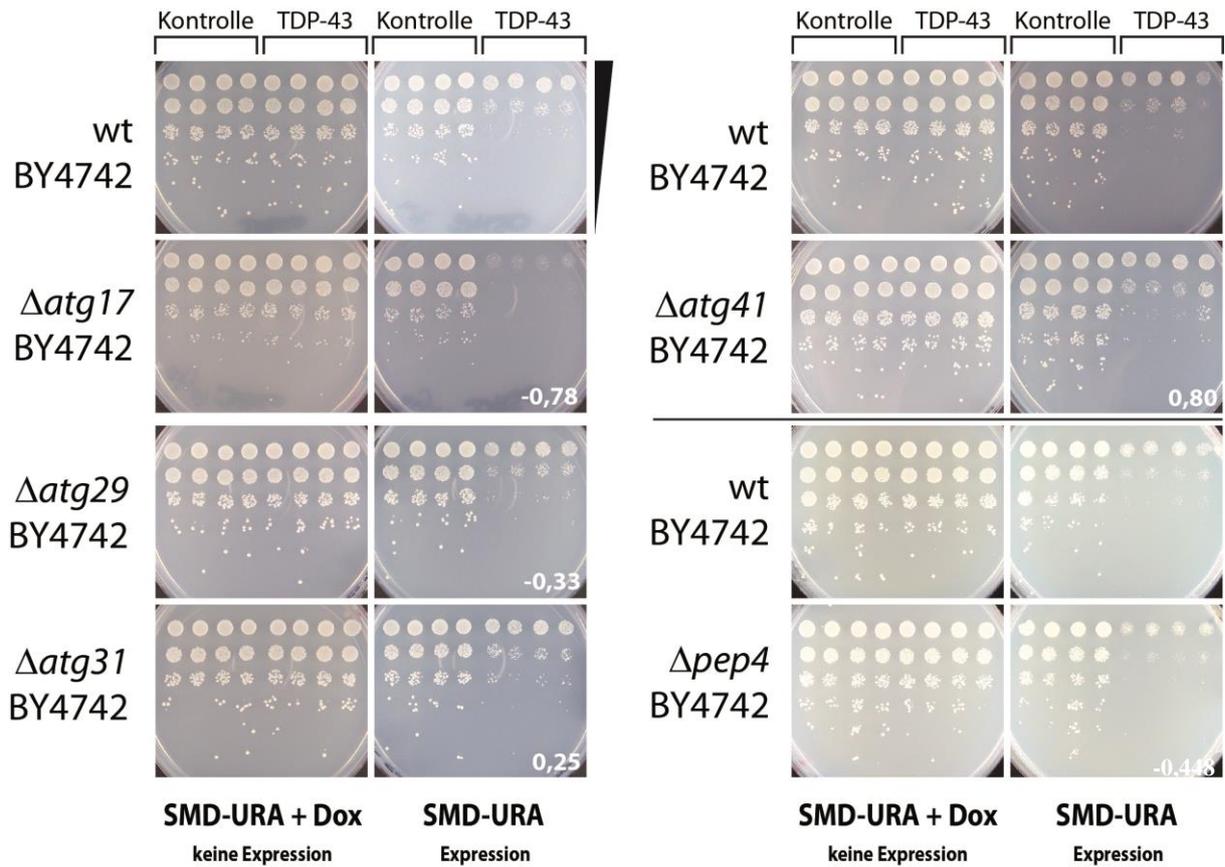


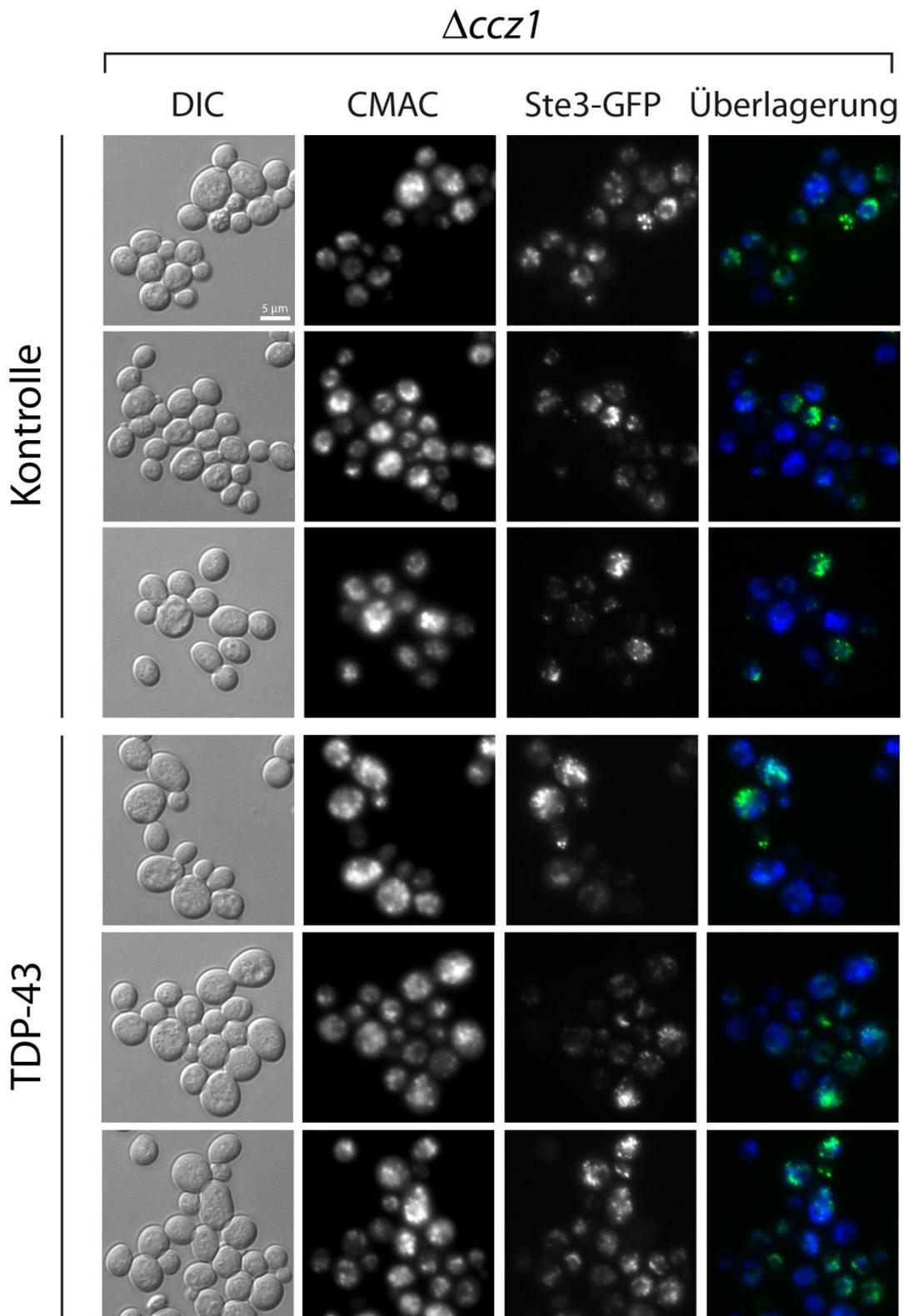
Abb. VII: Abbildungsbeschreibung siehe Fortsetzung nächste Seite.



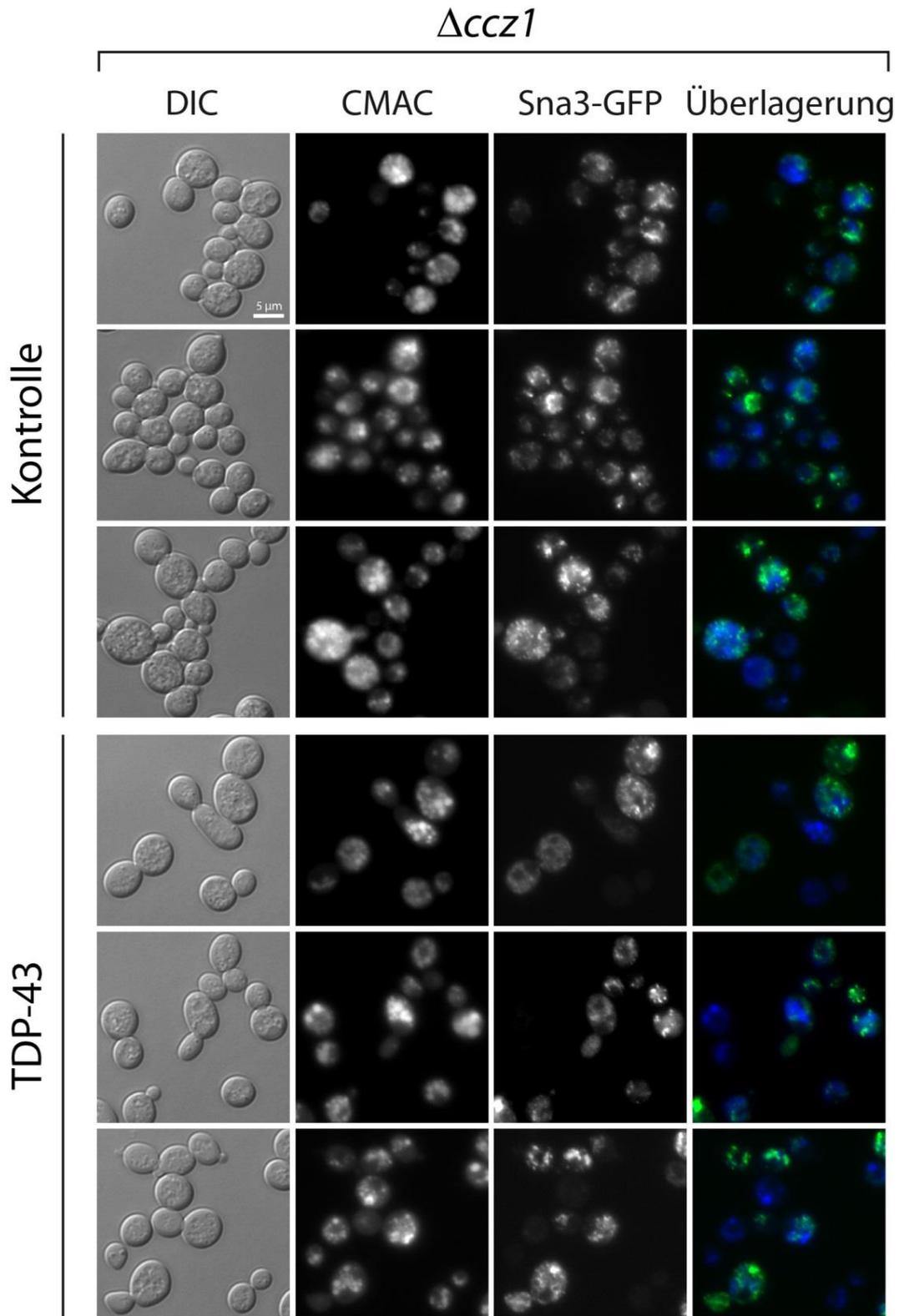
**Abb. VII: Die Expression von TDP-43 bedingt ein Wachstumsdefizit beim wt und bei Deletionsstämmen, denen Gene für die selektive Autophagie fehlen.** Die deletierten Stämme wurden in Abhängigkeit ihres Einsatzorts durch eine Doppellinie getrennt. Als erstes wurden die Deletionsstämmen für den Cvt-Weg, anschließend für die Mitophagie und als letztes für die Pexophagie aufgeführt. Die insgesamt für die selektive Autophagie untersuchten 23 Deletionsstämmen waren in ihrem Wachstum gegenüber dem stark reduziert bis stark verbessert (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer einfachen Trennlinie gekennzeichnet. Die mit einem \* gekennzeichneten wt-Stämme werden wiederholt in dieser und gegebenenfalls anderen Bildtafeln als Referenzstamm gezeigt, da sie in einem Experiment zusammen mit mehreren Deletionsstämmen getüpfelt und thematisch neu angeordnet wurden (z. B. Mitophagie-assoziierte Deletionsstämmen alphabetisch hintereinander geordnet).



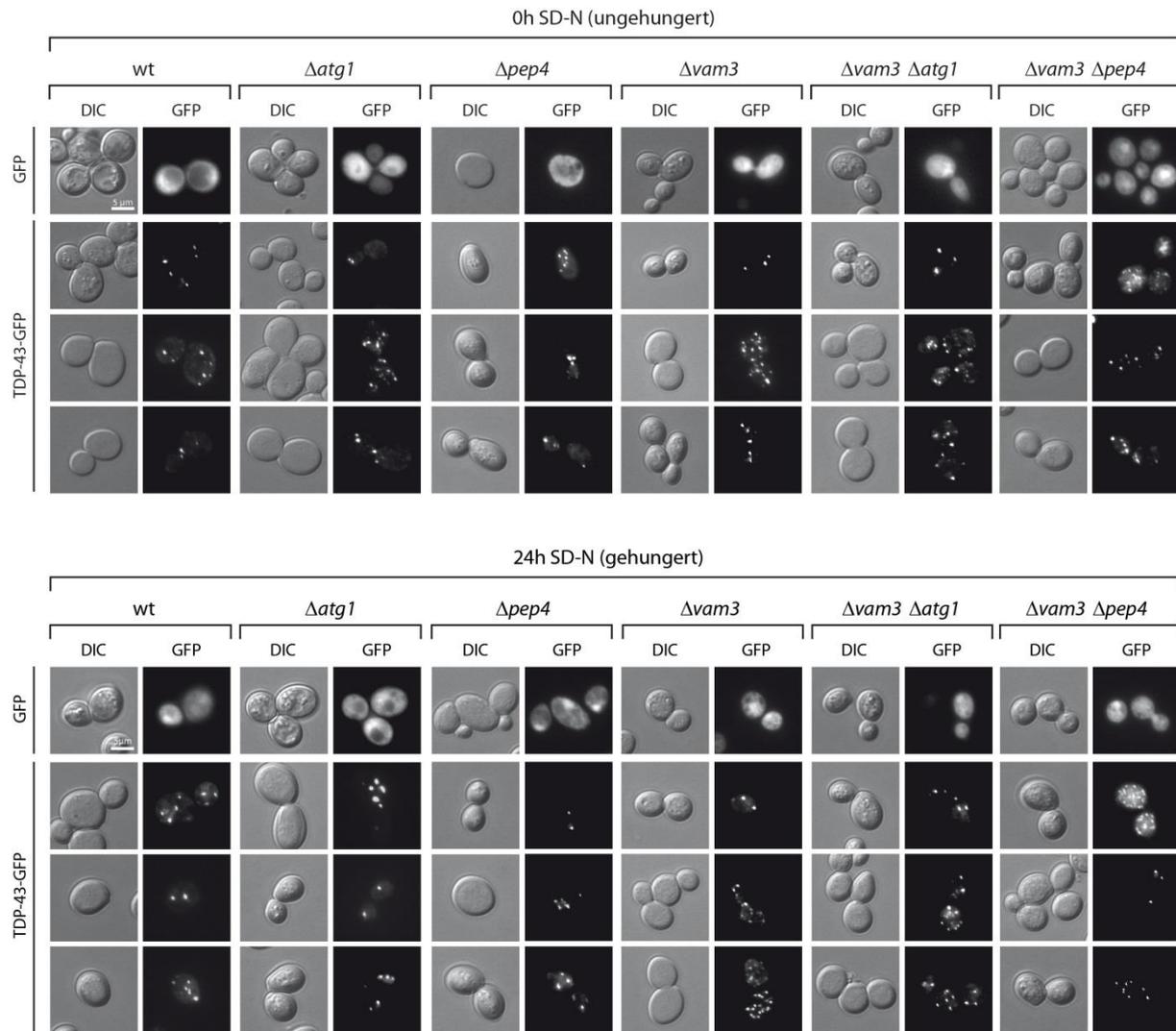
**Abb. VIII: Die TDP-43-Expression verursacht einen verminderten Wuchs beim wt und bei Deletionsstämmen, denen weitere Autophagie-relevante Gene fehlen.** Das Wachstumsverhalten der fünf untersuchten Deletionsstämme gegenüber dem wt umfasste das Spektrum von reduziert bis verstärkt (Zahlen entsprechen dem Wachstumsindex). Unabhängige Experimente wurden mit Hilfe einer Trennlinie gekennzeichnet.



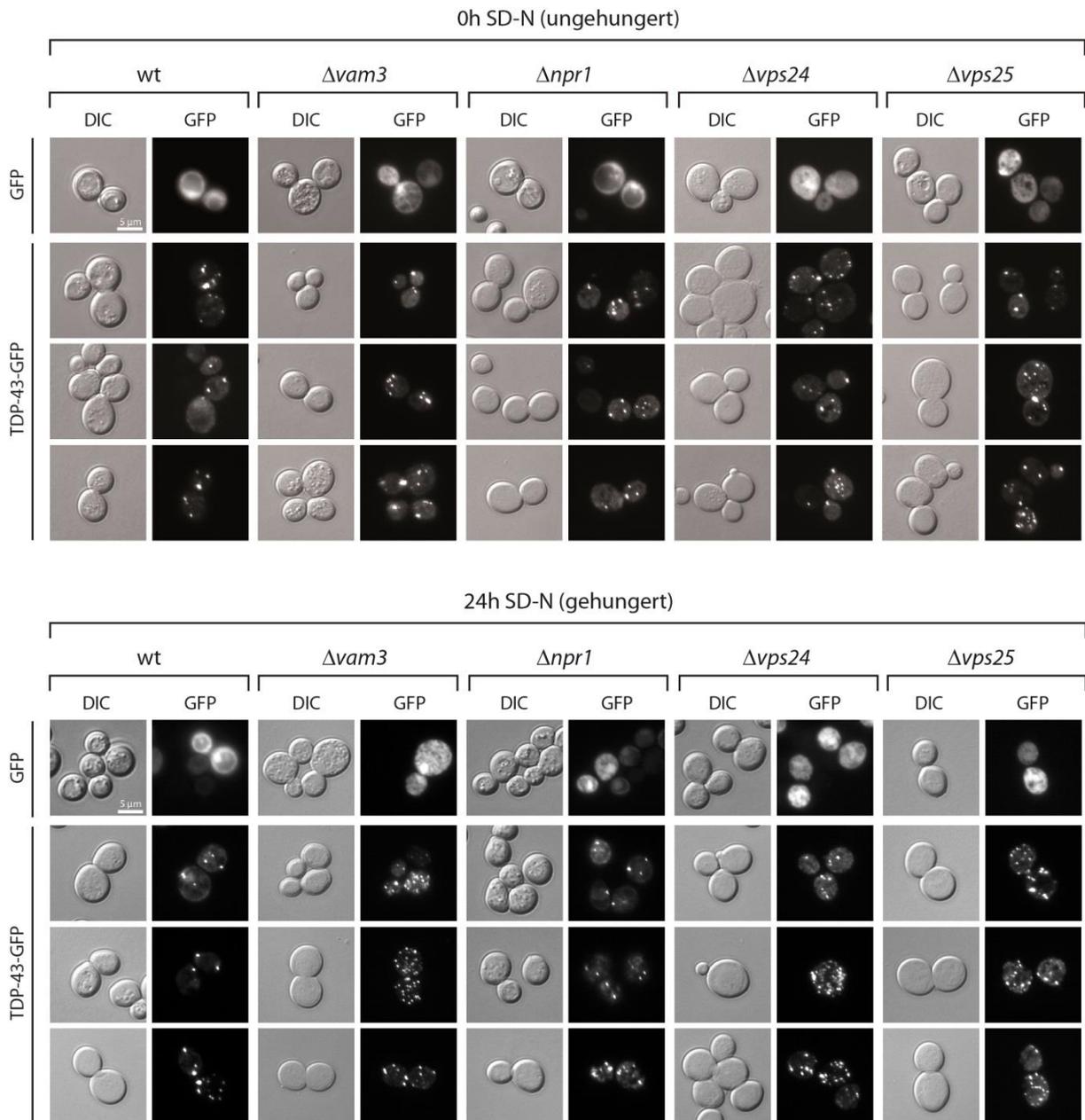
**Abb. IX: Der endosomal-vakuoläre Transport von Ste3-GFP ist bei  $\Delta ccz1$  gestört.** Der Deletionsstamm, welcher entweder ein Kontroll- oder ein TDP-43-codierendes Plasmid sowie ein Ste3-GFP-codierendes Konstrukt enthielt, wurde für ca. 16 Stunden in Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) angezogen. Der GFP-markierte Paarungspheromonrezeptor Ste3 wurde bei erfolgreicher Endozytose in die Vakuole aufgenommen und färbte diese grün (stabiles GFP). War der Transportprozess gestört, entstanden peri-vakuoläre, zytoplasmatische Punkte. Der proteolytische Prozess war unabhängig von TDP-43 in  $\Delta ccz1$  gehemmt. Die Vakuolen wurden mit CMAC gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m.



**Abb. X: Der endosomal-vakuoläre Transport von Sna3-GFP ist bei  $\Delta ccz1$  gestört.** Der Deletionsstamm, welcher entweder ein Kontroll- oder ein TDP-43-codierendes Plasmid sowie ein Sna3-GFP-codierendes Konstrukt enthielt, wurde über Nacht in Expressionsmedium (SMGal-Ura-His) angezogen. Der MVB-Marker Sna3-GFP färbte die Vakuole grün, wenn dieser durch den MVB-Weg in das Organell transportiert und dort das GFP abgespalten wurde. War der Transportprozess gehemmt entstanden peri-vakuoläre, zytoplasmatische Punkte. Der proteolytische Prozess war unabhängig von TDP-43 in  $\Delta ccz1$  gehemmt. Die Vakuolen wurden mit CMAC gefärbt. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .



**Abb. XI: Die Hemmung der Vakuolenfusion steigert die Anzahl der TDP-43-GFP-Aggregate.** Die wildtypischen,  $\Delta atg1$ ,  $\Delta pep4$ ,  $\Delta vam3$ ,  $\Delta vam3 \Delta atg1$  und  $\Delta vam3 \Delta pep4$  Zellen, welche TDP-43-GFP exprimierten, wurden während nährstoffreichen (SMD-Ura) und nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen kultiviert und mikroskopiert. Gezeigt werden die Zeitpunkte 0 und 24 Stunden. Der Zeitpunkt 6 Stunden ist in Abb. 34 dargestellt. Maßstab: 5  $\mu$ m



**Abb. XII: Die Hemmung des MVB-Wegs steigert die Anzahl der TDP-43-GFP-Aggregate.** Die Stämme (wt,  $\Delta vam3$ ,  $\Delta npr1$ ,  $\Delta vps24$ ,  $\Delta vps25$ ), welche TDP-43-GFP exprimierten, wurden während nährstoffreichen (SMD-Ura) bzw. nährstoffarmen (SD-N) Bedingungen kultiviert und geerntet. Gezeigt werden die Zeitpunkte 0 und 24 Stunden. Der Zeitpunkt 6 Stunden ist in Abb. 40 dargestellt. Maßstab: 5  $\mu$ m

# Publikationsliste

## Publikationen

Leibiger C.\*, Deisel J.\*, Aufschneider A., Ambros S., Tereshchenko M., Verheijen B. M., Büttner S., and Braun R. J. Endolysosomal pathway activity protects cells from neurotoxic TDP-43. *Microbial Cell*. 2018; **5**(4): 212–214.

Leibiger C.\*, Deisel J.\*, Aufschneider A., Ambros S., Tereshchenko M., Verheijen B. M., Büttner S. and Braun R.J. TDP-43 controls lysosomal pathways thereby determining its own clearance and cytotoxicity. *Hum Mol Genet*. 2018; **27**(9):1593-1607.

Braun R.J.\*, Sommer C.\*, Leibiger C.\*, Gentier R.J.G.\*, Dumit V.I., Paduch K., Eisenberg T., Habernig L., Trausinger G., Magnes C., Pieber T., Sinner F., Dengjel J., Van Leeuwen F.W., Kroemer G., and Madeo F. Accumulation of basic amino acids at mitochondria dictates the cytotoxicity of aberrant ubiquitin. *Cell Rep*. 2015; **10**(9): 1557-1571.

Leibiger C., Kosyakova N., Mkrtychyan H., Gleib M., Trifonov V., and Liehr T. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *J. Histochem. Cytochem*. 2013; **61**(4): 306-312.

Speit G., Leibiger C., Kuehner S., and Högel J. Further investigations on the modified comet assay for measuring aphidicolin-block nucleotide excision repair. *Mutagenesis* 2013; **28**(2): 145-151.

\*Diese Autoren haben gleichwertig zur Arbeit beigetragen.

# Posterpräsentationsliste

## Internationale Konferenzen

Leibiger C., and Braun R.J. Linking of autophagy and ubiquitin-proteasome system (UPS) in neurotoxic yeast cell death models. 12<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD) in Nice, France, March 2015

Leibiger C., and Braun R.J. Mitochondrial and autophagic activities in a TDP-43 neurotoxic yeast cell death model. Society for Neuroscience (SfN) in Washington D.C., USA, November 2014

Leibiger C., and Braun R.J. Linking mitochondrial and autophagic activities in neurotoxic yeast cell death models. 10<sup>th</sup> International Meeting on Yeast Apoptosis (IMYA) in Gothenburg, Sweden, May 2014

Leibiger C., Westermann B., and Braun R.J. Linking mitochondrial dynamics with neurotoxicity in yeast cell death models for amyotrophic lateral sclerosis. 11<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD) in Florence, Italy, March 2013

## Sonstige Veranstaltungen

Leibiger C., Westermann B., and Braun R.J. Linking mitochondrial dynamics with neurotoxicity in yeast cell death models for amyotrophic lateral sclerosis. BZMB PhD Symposium in Selb, Germany, October 2012

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während meiner Zeit als Doktorandin auf so vielfältige Weise unterstützt und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei ...

... PD Dr. Ralf Braun, für die Chance dieses Thema zu bearbeiten, für seine Einweisung in die Materie, für seine Anleitung, Ratschläge und Ideen. Darüber hinaus möchte ich Danke sagen für seine ausgezeichnete, gewissenhafte Betreuung, für sein stets offenes Ohr, für seine Gelassenheit und seine Nerven aus Drahtseilen, wenn sich seine Doktorandin am Rande eines Nervenzusammenbruchs befand.

... Prof. Dr. Benedikt Westermann für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren, für seine konstruktiven Vorschläge, Kritiken und seine Unterstützung.

... Prof. Dr. Klaus Ersfeld für seine Bereitschaft mein Mentor zu werden und seine kritischen Nachfragen und seine Anregungen im Mentoratsgespräch.

... allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Westermann. Dabei möchte ich mich besonders bei meinem langjährigen Laborkollegen Dirk Scholz bedanken. Danke für deine stetige Bereitschaft mir zu helfen und deinen Bestand, sowohl in wissenschaftlicher als auch in privater Hinsicht. Danke für die vielen wundervollen Gespräche (die trotz alledem immer zu kurz kamen), für die vielen schönen Tot-Lach-Momente sowie für die lockere, entspannte Arbeitsatmosphäre. Danke für die witzigen (und lauten) EM/WM Fernsehabeende und die wunderschönen, vorweihnachtlichen Backabeende zusammen mit Maria Stenger, Nadine Hock, Ann-Katrin Unger, Jana Deisel, Martina Culková und Xenia Chelius. Ich danke euch ebenso wie Stefan Böckler und Till Klecker für die gegenseitige Rücksichtnahme im Laboralltag, wodurch ein reibungsloses, produktives Arbeiten möglich war. Des Weiteren bedanke ich mich für eure Ratschläge und eure Unterstützung.

... Maria, Nadine, Jana und Lisa Sixt für das Lesen des Manuskripts.

... Annette Suske, unserer ersten Anlaufstelle in Dingen der Labororganisation, Informations- und Materialbeschaffung. Danke für dein stetig offenes Ohr bei persönlichen und wissenschaftlichen Problemen, für deine Hilfsbereitschaft und deinen Rückhalt.

... Petra Helies, unserer guten Fee. Ohne dich und deiner gut organisierten Spülküche hätte keines meiner Experimente gelingen können. Danke für deine herzliche, mütterliche Art und für die vertrauensvollen und aufbauenden Gespräche.

... meiner Familie. DANKE an meine Brüder und Doreen (meine zukünftige Schwägerin) dass ihr immer für mich da seid und ihr mir stets Rückenhalt gebt. Mein größter Dank geht allerdings an meine *Mamutschka*, die tagtäglich meine Sorgen und Probleme sowie die schönen Augenblicke aus der Ferne miterlebte und mit mir zusammen gelitten oder gelacht hat. Danke, dass du immer zugehört (und noch immer zuhörst), dass du mich stets wieder aufgebaut und mir Kraft gegeben hast weiterzumachen. Danke an deinen Glauben an mich und deine Fähigkeit meine Launen zu tolerieren sowie deine seelisch-moralische Unterstützung in allen Lebenslagen. ... **danke, Lieblingmensch! Schön, dass wir uns kennen!!!**

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

Bayreuth, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Christine Leibiger