

**Untersuchungen zur Bedeutung selektiver Autophagie für
Alterungsprozesse von *Podospora anserina***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Vanessa Henkel
aus Fulda

Frankfurt 2022
(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

1. Gutachter: Prof. Dr. H. D. Osiewacz
2. Gutachter: Prof. Dr. Donat Kögel

Datum der Disputation: 23.03.2023

„Ich möchte die Natur verstehen, ich möchte wissen, wie es dazu gekommen ist, dass etwas so ist.“

Prof. Dr. Dr. h.c. Christiane Nüsslein-Volhard

Konventionen zur Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen:

Gene werden *kursiv* geschrieben (z.B. *Atg24*, *Atg8*), die Zuordnung eines Gens einer bestimmten Art erfolgt durch den Zusatz der Abkürzung des Artnamen vor das jeweilige Gen (z.B. *PaAtg24* bei *Podospora anserina*, *ScAtg8* bei *Saccharomyces cerevisiae*). Proteine werden in Großbuchstaben und nicht kursiv geschrieben (z.B. ATG24, ATG8). Wenn ein Protein einer Art adressiert werden soll, wird ebenfalls die Abkürzung des Artnamens hinzugefügt (z.B. PaATG24, ScATG8). Fusionsgene und -proteine, also Gene bzw. Proteine, welche fusioniert wurden, werden durch zwei Doppelpunkten zwischen den Bezeichnungen dargestellt. Dabei wird der N-terminale Abschnitt zuerst genannt (z.B. PaAtg8::Gfp, bzw. PaATG8::GFP). Deletionsstämmen werden nach dem deletierten Gen benannt (z.B. *PaAtg24*-Deletionsstamm). Die Kurzform des Deletionsstammes erfolgt durch das Voranstellen des griechischen Buchstaben Δ ($\Delta PaAtg24$, $\Delta ScAtg8$). Doppelmutanten werden durch einen Schrägstrich gekennzeichnet, welcher zwischen den einzelnen Mutationen eingefügt wird (z.B. $\Delta PaAtg24/PaSod1::Gfp$). Antikörper werden durch den Zusatz „anti-“ dargestellt und werden nach dem Protein benannt, gegen welches sie gerichtet sind (z.B. anti-PaATG24).

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Was ist Altern?	1
1.1.1 Die Alterung des Menschen	1
1.1.2 Die Molekularbiologie des Alterns	2
1.1.3 Alters-abhängige Krankheiten	7
1.2 Endosomaler Transport und Autophagie	8
1.2.1 Der endosomale Transport in Zellen	8
1.2.2 Der Abbau von zellulären Bestandteilen durch die Autophagie	10
1.2.3 Der Lebenszyklus von Autophagosomen	12
1.2.4 Die Mitophagie	22
1.2.5 Eine evolutionsbiologische Betrachtung der Autophagie	24
1.3 Modellorganismen in der Alternsforschung	26
1.3.1 Die Autophagie von <i>Podospora anserina</i>	30
1.4 Ziel dieser Arbeit	32
Material und Methoden	34
2.1 Materialien	34
2.1.1 Chemikalien	34
2.1.2 Puffer und Lösungen	36
2.1.3 Anzuchtmedien	40
2.1.4 Stämme	42
2.1.5 Vektoren	42
2.1.6 Oligonukleotide	43
2.1.7 Enzyme	43
2.1.8 Kits	44
2.1.9 Hybridisierungssonden	44
2.1.10 Antikörper & Sekundärantikörper	44
2.1.11 Größenstandards	45
2.1.12 Geräte	45
2.1.13 Computerprogramme	47
2.1.14 Sonstige Materialien	48
2.2 Methoden	49
2.2.1 Spezifische Methoden für <i>E. coli</i>	49
2.2.2 Spezifische Methoden für <i>P. anserina</i>	49
2.2.3 Spezifische Methoden zur DNA-Analyse	53

2.2.4	Spezifische Methoden zur RNA-Analyse	57
2.2.5	Spezifische Methoden zur Protein-Analyse	60
2.2.6	Spezifische Methoden zur mikroskopischen Analyse	62
Ergebnisse		64
3.1	Beobachtung des Einflusses von PaATG8 auf die Autophagie von <i>P. anserina</i>	64
3.1.1	Untersuchung der PaATG8-unabhängigen nicht-selektiven Autophagie	67
3.1.2	Betrachtung der Mitophagie nach Verlust von PaATG8	69
3.2	Untersuchung des putativen Autophagie-relevanten Proteins PaATG11	71
3.2.1	Analyse der nicht-selektiven und selektiven Autophagie nach Verlust von PaATG11 . .	73
3.3	Die Rolle des sortierenden Nexins PaATG24 in <i>P. anserina</i>	76
3.3.1	Bestimmung der nicht-selektiven und selektiven Autophagie in $\Delta PaAtg24$	78
3.3.2	Untersuchung der Mitochondrienfunktion und -morphologie bei Autophagiedefizienz .	82
3.3.3	Analyse zum Einfluss von Alterungsprozessen und Autophagie auf die PaATG24-Menge	92
3.3.4	Untersuchung der Autophagosomen in $\Delta PaAtg24$	96
3.3.5	Betrachtung der Vakuole als Komponente des autophagischen Abbauweges	100
Diskussion		106
4.1	<i>P. anserina</i> hat einen PaATG8-unabhängigen Mechanismus zum Abbau von Mitochondrien in den Vakuolen	107
4.2	Auswirkung des PaATG11-Verlustes auf die selektiven und nicht-selektiven Autophagie . . .	111
4.3	PaATG11 ist bedeutend für die Morphologie und Funktion der Mitochondrien juveniler <i>P. anserina</i> -Stämme	115
4.4	PaATG24 ist mehr als ein putatives Mitophagierezeptorprotein	117
4.5	Autophagie als ein Netzwerk von Proteininteraktionen	119
4.6	Der Verlust von PaATG24 führt zu einer Akkumulationen von Autophagosomen	121
4.7	Die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion erfolgt PaATG24-unabhängig	123
4.8	Das sortierende Nexin PaATG24 koordiniert die Größe und Morphologie der Vakuolen von <i>P. anserina</i>	126
Ausblick		130
Zusammenfassung		132
Anhang		134
Literaturverzeichnis		137
Abbildungsverzeichnis		163

Tabellenverzeichnis	165
Publikationen und Konferenzen	166
Danksagung	167
Curriculum Vitae	168

Einleitung

1.1 Was ist Altern?

1.1.1 Die Alterung des Menschen

Die Entwicklung des Menschen beginnt bei der Verschmelzung einer Spermienzelle mit einer Eizelle. Anschließend erfolgt eine Vielzahl von Zellteilungen und der Embryo wächst bis zum Fötus heran. Bei der Geburt ist aus einer einzelnen Zelle ein Baby geworden, welches im Schnitt $1,25 * 10^{12}$ Zellen besitzt (Osgood 1955). Über die Stadien des Kleinkinds, des Kindesalters, der Pubertät und der Jugendlichen, erfolgt das Erwachsen-werden eines Menschen. Biologisch betrachtet ist ein Mensch mit der Geschlechtsreife voll entwickelt. In Deutschland gilt ein Mensch ab 18 Jahren als volljährig, strafrechtlich wird jedoch noch in „junge Volljährige“ unterschieden, wodurch eine Spanne von 18 bis 27 Jahren abgedeckt wird (§ 7 Abs. 1 Nr. 3 SGB VIII). Nach dem Heranreifen eines Menschen erfolgt die Alterung, welches allgemein hin als biologischer Prozess angesehen wird, der mit einer Abnahme der physiologischen Funktionen assoziiert ist und im Tod des Organismus endet (Kirkwood und Austad 2000; López-Otín et al. 2013). In einer viel beachteten Schrift von Hayflick aus dem Jahre 1998 befasst sich der Autor mit den Fragen wie und warum wir altern (Hayflick 1998). Er verweist darauf, dass Altern ein genereller Prozess ist, welcher bei jedem Menschen im Laufe der Zeit auftritt und auch nicht nur auf Menschen begrenzt ist, sondern praktisch alle Arten betrifft. Altern sei oft mit Erkrankungen assoziiert, jedoch nicht der Faktor, welcher das Altern auslöst, da es keine Krankheit gebe, welche alle Individuen erst nach dem fortpflanzungsfähigen Alter betrifft (Hayflick 1998). Nach Hayflick ist Altern ein Artefakt der menschlichen Zivilisation, bedingt durch die Errungenschaften der Neuzeit. Hierzu passt, dass die Lebenserwartung von uns Menschen aufgrund der aktuell vorliegenden Ernährungsmöglichkeiten und der verbesserten medizinischen Versorgung stetig steigt. Eine Frau, die vor 80 Jahren im Jahr 1942 geboren wurde, hatte bei der Geburt eine Lebenserwartung von 76,73 Jahren. Zum Vergleich hat ein Kind, welches im Jahr 2020 geboren wurde, eine Lebenserwartung von 86,90 Jahren, wenn es ein Mädchen ist und 82,85 Jahren bei einem Jungen (Statistisches Bundesamt 2020). Insgesamt kann bei Frauen eine längere Lebensspanne festgestellt werden. Bei den aktuell 10 nachweislich ältesten noch lebenden Menschen handelt sind jeweils um Frauen in einem Alter von 114 Jahren

bis 118 Jahren. Die unterschiedliche Lebenserwartung zwischen den Geschlechtern konnte ebenso bei Untersuchungen über verschiedene Arten hinweg beobachtet werden (Xirocostas et al. 2020). Dabei zeigte sich, dass unter anderem die Geschlechtschromosomen einen Einfluss auf die Lebensspanne haben. Homogametische Individuen einer Art zeigen insgesamt eine um 17,6 % längere Lebensspanne als heterogametische Individuen (Xirocostas et al. 2020). Die Lebensspanne ist somit nicht nur von den Lebensumständen, sondern auch von molekularbiologischen Faktoren und Prozessen abhängig, welche die Lebensspanne und die Alterung eines Individuums beeinflussen.

1.1.2 Die Molekularbiologie des Alterns

Durch Zellkulturexperimente konnte bereits in 1961 durch Hayflick und Moorhead gezeigt werden, dass humane Fibroblasten eine begrenzte Zellteilungsrate besitzen. Sobald diese erreicht wurde, kam es zu einem irreversiblen Stillstand des Wachstums, welcher als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick und Moorhead 1961). Darauf basierend ging man davon aus, dass Alterung auf einem Verlust der Zellen zur Proliferation basiert und durch eine Akkumulation von geschädigten Zellen die Fähigkeit zur Regeneration verloren geht (Ames 1989). In den 1990er Jahren wurde festgestellt, dass Alterung auch durch Onkogene und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen ausgelöst werden kann (Serrano et al. 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die altersbedingte Seneszenz hierbei hauptsächlich durch fehlerhafte DNA-Replikation und eine Akkumulation von DNA-Schäden ausgelöst wird (Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006).

Auf zellulärer Ebene kann festgestellt werden, dass während der Alterung sowohl genetische als auch proteinbiochemische Schäden akkumulieren, welche destruktiv für die zelluläre Homöostase sind. So ist das Altern mit einem Anstieg von Krebserkrankungen assoziiert, da bei jeder Zellteilung Veränderungen der Gensequenz aufgrund der höheren Anzahl von Zellteilungen auftreten können (de Magalhães 2013). Des Weiteren hat man mit jedem Lebensjahr eine längere Exposition zu Umweltfaktoren wie der Sonnenstrahlung, die im Laufe der Zeit DNA-Schäden hervorrufen können (Ames 1989).

Das Altern kann durch verschiedene molekularbiologische Prozesse ausgelöst werden. Hierzu liegen verschiedene Theorien vor, wie zum Beispiel, dass Altern ein regulierter Prozess sei, jedoch

genetisch bedingten Limitationen unterliegt, wie der zellulären Teilungszahl, der Telomerlänge oder der spatio-temporalen Genexpressionsregulierung (Aubert und Lansdorp 2008; Hayflick und Moorhead 1961; Qiu et al. 2021; Seroude et al. 2002). Im Gegensatz dazu beschreibt die sogenannte „stochastische Theorie“ eine zufällige Anhäufung von zellulären Schäden, welche zu einer zellulären Alterung führen. Eine weitere und sehr häufig zitierte Theorie stellt die „Theorie der freien Radikale“ nach Harman dar. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativen Schäden an zellulären Molekülen führt. Diese akkumulieren im Laufe der Zeit und es kommt dadurch zu einer Verschlechterung der Zellfunktion (Harman 1956). Durch die molekularbiologische Forschung ist inzwischen bekannt, dass ROS neben den zellulären Schäden auch weitere, essenzielle Funktionen als Signalmolekül besitzen. Alterung ist insgesamt ein multifaktorieller Prozess. Eine Kategorisierung dieser Prozesse wurde unter anderem durch López-Otín et al. (2013) durchgeführt, welcher die sogenannten „Nine Hallmarks of Aging“ (dt: „Die neun Merkmale des Alterns“) zusammengefasst und aufgearbeitet hat. Dabei wurden drei Hauptkategorien gebildet, welche ineinander übergehen: Die primären Merkmale, welche auf zellulären Schäden basieren, die antagonistischen Merkmale, welche die Schadensantworten darstellen und die integrativen Merkmale, welche den Phänotyp der Alterung verursachen.

Die primären Merkmale des Alterns

Die genetische Instabilität beschreibt eine Akkumulation von DNA-Mutationen und DNA-Veränderungen, welche einen destruktiven Einfluss auf die Zellen hat. Die DNA-Schäden können zum einen bei jeder Zellteilung auftreten, zum anderen auch durch DNA schädigende Moleküle, wie DNA-interkalierende Moleküle, radioaktive Strahlung, Chemotherapeutika oder auch ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) (Yousefzadeh et al. 2021). Eine einzelne beschädigte Zelle hat noch keine großen Auswirkungen auf den Organismus. Wenn es während der Alterung jedoch zu einer Häufung von geschädigten Zellen bedingt durch DNA-Veränderungen kommt, kann dies zu Organ- oder Gewebeschäden führen. Bei Patienten, welche durch eine Chemotherapie eine Krebserkrankung besiegt haben, kann eine vorzeitige Alterung festgestellt werden und die Patienten zeigen frühzeitig Gebrechlichkeit und andere Alters-assoziierte Symptome (Hurria et al. 2016; Killock 2014).

Mit der genetischen Stabilität sind die Telomere verknüpft. Diese DNA-Sequenzen befinden sich an den äußeren Bereichen der Chromosomen, damit es zu keiner Aktivierung von DNA-Reparatursystemen kommt, welche üblicherweise bei einem Chromosomenstrangbruch die beiden freien DNA-Stränge wieder zusammenfügen (Aubert und Lansdorp 2008; Lu et al. 2013). Dieser Mechanismus würde zwei Chromosomen miteinander verknüpfen, wodurch es bei der Zellteilung zu Chromosomenabberationen kommen könnte. Die Telomere am Ende der Chromosomen verkürzen sich jedoch bei jeder Zellteilung einer somatischen Zelle, sodass es im Laufe der Alterung zu einer genomischen Instabilität kommen kann (Lu et al. 2013). Das Enzym, welches der Verkürzung der Telomere entgegenwirkt, stellt die Telomerase dar. Die Aktivität von Telomerasen konnte in gametischen Zellen, Stammzellen und Tumorzellen gezeigt werden (Zvereva et al. 2010). Eine Aktivierung von Telomerasen und damit verbundene Aufrechterhaltung und Verlängerung der Telomere hat somit nicht nur positive Effekte, sondern birgt auch das Risiko der Tumorbildung.

In einer Zwillingsstudie der NASA wurde der Einfluss der Schwerelosigkeit auf den menschlichen Körper untersucht (Garrett-Bakelman et al. 2019). Von den eineiigen Zwillingsbrüdern war einer ein Jahr auf der internationalen Raumstation ISS, während der andere Zwillingsbruder auf der Erde blieb. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Aufenthalt in der Schwerelosigkeit unter anderem zu einer Telomerverlängerung (protektive DNA-Sequenzen an den Chromosomenden) aber auch einer Genominstabilität führt. 6 Monaten nach Rückkehr auf die Erde war eine Normalisierung der durchschnittlichen Telomerlänge zu beobachten, jedoch kam es zu einer erhöhten Anzahl an verkürzten Telomeren, sowie zu einer veränderten Genexpression, deren Auswirkungen noch nicht abschließend geklärt sind (Garrett-Bakelman et al. 2019).

Neben den direkten DNA-Veränderungen sind auch epigenetische Modifikationen mit der Alterung verknüpft. Unter Epigenetik versteht man die modifizierbaren und variablen Elemente, welche die Transkription von Genen regulieren. Dies umschließt DNA-Methylierungen, Histon-Modifikationen und mikroRNA-Expression. Untersuchungen haben gezeigt, dass es im Laufe der Alterung zu einer Veränderung der Methylierungsmuster der DNA kommt (Mostoslavsky et al. 2006; Oberdoerffer et al. 2008). Eine Veränderung der Genregulation wirkt sich auf Proteom und somit den Organismus aus. Das Proteom spielt eine zentrale Rolle bei der Alterung. Die ausbalancierte Bildung und Degeneration von Proteinen wird Proteostase genannt. Die Proteinsynthese, Proteinfaltung, Aufrechterhaltung der Proteinstruktur und die anschließende Degradation von Proteinen ist elementar, um die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten (Klaips et al. 2018). Bei einer beeinträchtigten Proteostase kann es zu einer

Akkumulation von geschädigten und fehl-gefalteten Proteinen kommen. Diese wiederum beeinträchtigen die zelluläre Funktion (Jayaraj et al. 2020). Untersuchungen haben gezeigt, dass es im Laufe der Alterung immer häufiger zu Proteinaggregaten kommt, dabei unter anderem auch durch die bereits zuvor benannten primären Merkmale des Alterns (Ilyinsky et al. 2021). Dabei können zwei Ursachen festgestellt werden. Zum einen funktioniert die Bildung, Faltung und Aufrechterhaltung von Proteinen nicht mehr adäquat und zum anderen werden geschädigte Proteine nicht mehr, oder nur noch partiell abgebaut (Jayaraj et al. 2020). Die entstehenden Proteinaggregate stehen in Verdacht an der Entstehung von Alters-assoziierten Erkrankungen, vor allem im neurologischen Bereich, beteiligt zu sein (Hipp et al. 2014; Ross und Poirier 2004).

Die antagonistischen Merkmale des Alterns

Bei den antagonistischen Altersmerkmalen handelt es sich um zelluläre Prozesse welche sowohl vorteilhaft, als auch nachteilig für die Zelle sein können. Dabei kommt es auf die Stärke des jeweiligen zellulären Stresses an. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein leichter mitochondrialer Stress, eine leichter Nährstoffmangel und die zelluläre Seneszenz einen positiven Effekt auf die Zelle haben und zur Langlebigkeit beitragen. Wenn jedoch ein zu hohes Stresslevel vorliegt, kann die Zelle die Schäden nicht mehr kompensieren und es kommt zu einer Verringerung der Lebensspanne. Die verschiedenen Stressfaktoren wurden in Zellkultur, sowie an Modellorganismen untersucht und beschrieben. Gleichzeitig kommt es im Laufe der Alterung zu Veränderungen der jeweiligen Systeme. Die Zelle ist in der Lage die umgebenden Nährstoffbedingungen zu erkennen und daraufhin zelluläre Anpassungen an einen Nährstoffmangel oder -überschuss durchzuführen (van der Rijt et al. 2020). Mit dem Alter kommt es jedoch zu einer Veränderung der Signalwege der Nährstofferkennung. Bei diesen Signalwegen handelt es sich um den Insulin/IGF1-Stoffwechselweg, mTOR (*Mechanistic Target of Rapamycin*), den Sirtuin-Stoffwechselweg und den AMP-aktivierte Proteinkinase-Stoffwechselweg (AMPK) (Pan und Finkel 2017). Diese Signalwege werden je nach Nährstoffsituation aktiviert oder deaktiviert. Dabei führt eine hohe Nährstoffkonzentration zur Aktivierung des Insulin/IGF1-Stoffwechselwegs und mTOR. Dadurch wird die Glucoseaufnahme und die Proteinbiosynthese angeregt und Prozesse der zellulären Degradation,

wie Autophagie werden inhibiert (anabole Reaktion) (Barclay et al. 2019). Bei einer Nährstoffrestriktion kommt es hingegen zu einer Aktivierung der AMPK und von Sirtuinen, welche die mitochondriale Biogenese, Stressreaktionen und die Autophagie initiieren (katabole Reaktion) (Ruderman et al. 2010). Sowohl die Inhibierung der anabolen Reaktion, als auch die Aktivierung der katabolen Reaktion kann zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen (Harrison et al. 2009; Pearson et al. 2008). Ebenso zeigt ein leichter mitochondrialer Stress einen positiven Effekt bei der Verlängerung der Lebensspanne, ein Übermaß resultiert jedoch in einer Verkürzung der Lebensspanne. Dieser Effekt wird Mitohormesis genannt.

Die Mitohormesis beschreibt eine biologische Reaktion auf geringen mitochondrialen Stress, welcher vorteilhaft für Zellen ist. Dabei muss jedoch ein Gleichgewicht gewahrt werden, da ein Übermaß an mitochondrialem Stress sich wiederum destruktiv auswirkt. Durch die Mitohormesis kommt es in einer Vielzahl von Modellorganismen zu einer Lebensverlängerung und Steigerung der Gesundheit. Wenngleich der exakte Wirkmechanismus bisher noch nicht vollständig aufgedeckt wurde, scheint die Mitohormesis im Zusammenhang mit einem Anstieg von mitochondrialem ROS zu stehen (Bárcena et al. 2018).

Während der Alterung hören Zellen auf sich zu teilen, dieser Übergang wird als zelluläre Seneszenz bezeichnet. Es kommt zu einer Ansammlung dieser seneszenten Zellen in allen Geweben während des Alterns (Hudgins et al. 2018). Da diese Ruhephase durch eine Ausschüttung von Entzündungssignalfaktoren gekennzeichnet ist, beeinträchtigt die Anhäufung dieser Zellen das umliegende Gewebe. Es kommt zu verstärkten Entzündungsreaktionen, einer Beeinträchtigung des umliegenden Gewebes und Reduktion der funktionalen Stammzellen (López-Otín et al. 2013; McHugh und Gil 2018). Durch diese Effekte wird die Alterung des Organismus verstärkt. Ausgelöst wird die zelluläre Seneszenz zum Beispiel über die genomische Instabilität oder die Telomerverkürzung (McHugh und Gil 2018).

Die integrativen Merkmale des Alterns

Durch die zelluläre Seneszenz kann es zu einer Reduktion der funktionalen Stammzellen kommen. Grundsätzlich sind Stammzellen in der Lage sich selber zu erneuern und so die Stammzellfunktion aufrecht zu erhalten. Diese Erneuerungsfähigkeit verringert sich jedoch mit dem Altern (Ermolaeva et al. 2018). Hintergrund hierfür sind wieder Faktoren, welche den primären Merkmalen des Altern zugeordnet werden können, wie Genmutationen, Epigenetik und Telomerverkürzungen (Ermolaeva et al. 2018; López-Otín et al. 2013). In mehrzelligen

Organismen sind die Zellen in einem kontinuierlichen Austausch miteinander. Seneszente Zellen schütten Entzündungsfaktoren aus, welche das umliegende Gewebe beeinflussen. Dadurch kommt es zu einer veränderten intrazellulären Kommunikation, durch welche sich die Zellen gegenseitig beeinflussen. Des Weiteren kann ein Anstieg der Entzündungsfaktoren auch durch epigenetische Ursachen, oder durch einen Anstieg an Proteinaggregaten erfolgen. Altern ist mit chronischen Entzündungen assoziiert, welche bei Menschen zu einer hohen Anfälligkeit für chronische Erkrankungen, Behinderung, Gebrechlichkeit führt und zu einem frühzeitigen Tod führen kann (Ferrucci und Fabbri 2018).

Insgesamt zeigt sich, dass die neun Merkmale des Alterns nicht isoliert voneinander betrachtet werden werden, da alle miteinander verbunden sind und dadurch das komplexe System des Alterns bewirken. Jedes der Merkmale kann zu einer Verkürzung oder Verlängerung der Lebensspanne eines Menschen beitragen. Auch sind der Großteil der Alternsmerkmale als Auslöser für Alterns-assoziierte Krankheiten beschrieben.

1.1.3 Alters-abhängige Krankheiten

Basierend auf der immer älter werdenden Bevölkerung zeigt sich immer deutlicher, welchen Einfluss die Alters-assoziierten Schäden auf die Gesundheit der Menschen hat. Vor allem in der Neurologie zeigt sich, wie wichtig die zellulären Transport- und Reparatursysteme sind.

Die häufigste altersbedingte Krankheit stellt die Alzheimer-Krankheit dar (O'Sullivan und Lindsay 2020). Dabei handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die charakteristische Ablagerungen von β -Amyloid-Plaques und neurofibrillären, fehlgefalteten Tau-Proteinen aufweist (Gallardo und Holtzman 2019; Hardy und Higgins 1992). Typisch für die Alzheimererkrankung sind Gedächtnisverlust, Verwirrung und Denkschwierigkeiten aufgrund einer Beeinträchtigung der Verbindung zwischen den Gehirnzellen. Dies wird durch extrazelluläres β -Amyloid verursacht, welches zunächst in den Neuronen aufgrund von Defekten im endosomalen Transportweg akkumuliert, bevor es anschließend sezerniert wird (Cataldo et al. 2000; Hardy und Higgins 1992). Die zweithäufigste altersbedingte neurologische Erkrankung ist die Parkinson-Krankheit (O'Sullivan und Lindsay 2020). Dabei handelt es sich um eine neurodegenerative Multisystemerkrankung, deren Pathologie sich vor allem im motorischen Bereich befindet. Typischerweise entwickeln Parkinson-Patienten

einen Ruhetremor, Bradykinesie, sowie eine Instabilität beim Stehen, jedoch sind auch weitere Symptome wie Depressionen mit Parkinson assoziiert. Ursächlich für die typischen Parkinson-Symptome ist der Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra, sowie der Bildung von sogenannten Lewy-Körperchen in den verbleibenden Neuronen (Sveinbjornsdottir 2016). Dabei handelt es sich um Proteinaggregate von fehlgefaltetem α -Synuclein, welche ebenfalls durch eine Beeinträchtigung des endosomalen Transportweges akkumulieren und von den Neuronen sezerniert werden (Chutna et al. 2014). Neben der α -Synuclein-Proteinaggregate spielen die Mitochondrien eine bedeutende Rolle bei der Parkinson-Erkrankung. Der Verlust der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra wird unter anderem auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückgeführt (Ballard et al. 1985; Haddad und Nakamura 2015).

Zur Vermeidung von lebensspannenverkürzenden Krankheiten sind die zellulären Qualitätskontrollsysteme essenziell. Diese Systeme haben sich im Verlauf der Evolution entwickelt und sorgen dafür, dass die zellulären Abläufe funktionieren. Dabei gibt es zwei Hauptaufgaben: Zum einen das Verhindern von zellulären Schäden und zum anderen die Reparatur- und Recyclingsysteme, wenn bereits eine Beeinträchtigung vorliegt. Dabei stellt vor allem das Reparatur- und Recyclingsystem innerhalb der Zelle ein komplexes Transport- und Versorgungssystem zur Koordination und Rekrutierung aller notwendigen Lipide und Proteine dar.

1.2 Endosomaler Transport und Autophagie

1.2.1 Der endosomale Transport in Zellen

Innerhalb von Zellen werden Proteine und Lipide über Endosomen zu ihrem Bestimmungsort transportiert. Dabei existiert eine Vielzahl von Proteinen, die entweder direkt oder indirekt an diesem Verteilungssystem beteiligt sind. Innerhalb des endosomalen System wird zwischen dem anterograden und dem retrograden Transport unterschieden. Dabei beschreibt Anterograd den Transport vom Zellkern weg und Retrograd den Transport zum Zellkern hin. Bei dem anterograden Transport werden Proteine und Lipide, ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert (Saimani

und Kim 2017). Von dort aus werden die zellulären Bestandteile zum Endosom transportiert, wo die Sortierung der Membranen und Proteine stattfindet (Hunt et al. 2013; Liu et al. 2012; Lu und Hong 2014). Ausgehend vom Endosom kommt es entweder zu einem Transport zur Plasmamembran (auch sekretorischer Transportweg genannt) und anschließender Exocytose, oder die Membranen und assoziierten Proteine werden Teil des autophagosomalen/lysosomalen Abbauweges (Chi et al. 2015; Gao et al. 2018; Liu et al. 2012). Ein essenzieller Transportweg stellt die Rückgewinnung von Proteinen und Membranen und somit der retrograden Transport dar (Balderhaar et al. 2010; Gallon und Cullen 2015; Ma und Burd 2020; Suzuki und Emr 2018a,b). Bei diesem Endosom-zu-TGN-Transportweg werden die Bestandteile der Sekretionsmaschinerie, wie Rezeptoren, oder Adapterproteine, recycelt (Burda et al. 2002; Lu und Hong 2014). Für diesen Transport müssen zunächst die zu sortierenden Proteine durch eine spezifische Sequenz identifiziert werden (Cabrera et al. 2014; Gan et al. 2013).

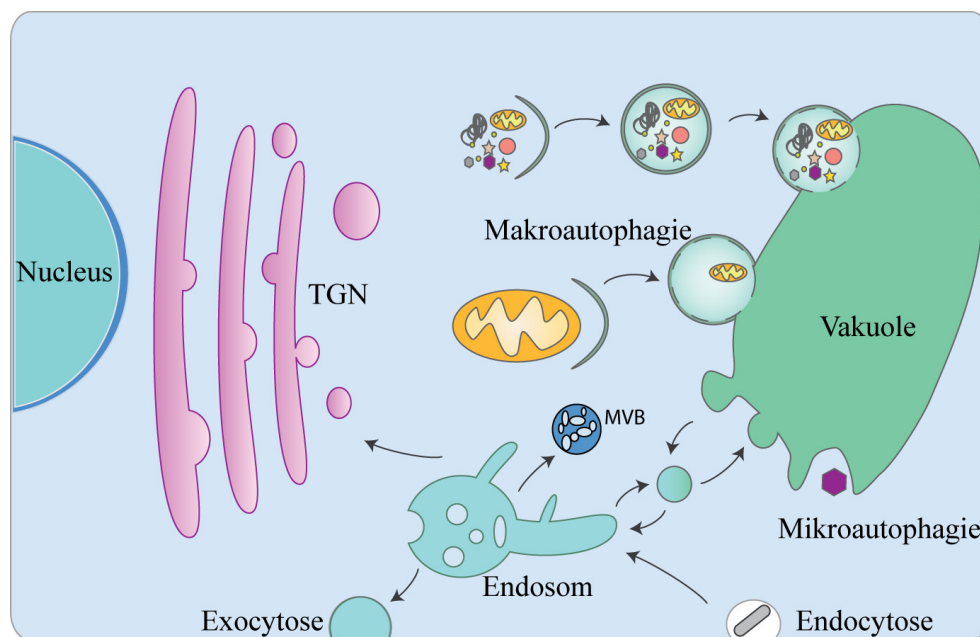


Abbildung 1: Übersicht der verschiedenen Wege des endosomalen Transports.

Der endosomale Transport beschreibt die verschiedenen Transportwege von Membranen und Proteinen. Dabei interagieren Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), Endosom und Vakuole/Lysosom durch Vesikel miteinander. Ebenso findet die Aufnahme und Abgabe von Stoffen über die Endo- und Exozytose der Zelle statt.

Quelle: Modifiziert nach Li und Kane (2009)

Anschließend kommt es zu einer Bildung von Cargo-angereicherten endosomalen Strukturen, bevor diese entstehenden Vesikel abgeschnürt werden (Seaman et al. 1998; Traer et al. 2007; van Weering et al. 2012a,b). Diese Vesikel werden anschließend mit Hilfe des Cytoskeletts zum TGN transportiert (Saimani und Kim 2017). Durch spezifische Verknüpfungs-Proteine des TGN

kommt es zu einer Fusion des Vesikels mit der Golgi-Membran, wodurch die Membranproteine und Lipide wieder für einen erneuten anterograden Transport zur Verfügung stehen (Cheung und Pfeffer 2016).

Beim Endosom unterscheidet man in Säugerzellen zwischen dem frühen Endosom (EE, *early endosome*) und dem späten Endosom (LE, *late endosome*). Dabei besteht das frühe Endosom aus zwei Unterstrukturen, dem tubulären endosomalen Netzwerk (TEN, *tubular endosomal network*) und der vakuolären Domäne (VD, *vacuolar domain*), welche ein Knotenpunkt sowohl für die Endosomenreifung, als auch für die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) darstellt. Diese ILV sind Vesikel, welche sich im Lumen des späten Endosoms befinden (Bonifacino und Rojas 2006). Bei dem späten Endosom kommt es in Säugerzellen zur Fusion mit dem Lysosom und es stellt somit eine Komponente des autophagischen Abbauweges dar. In *S. cerevisiae* wurden verschiedene Arten von Endosomen beschrieben, jedoch ist die exakte Organisation des endosomalen Systems noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen zeigen, dass eine Struktur namens pre-vakuläres Endosom (PVE) die Aufgaben eines Endosoms in *S. cerevisiae* übernimmt und eine evolutionsbiologisch ursprüngliche Organisation des endosomalen Membransystems darstellt (Day et al. 2018). Das PVE (im Folgenden als Endosom bezeichnet) scheint sowohl selbst in Verbindung zur Vakuole zu stehen, wie es auch in Säugern beschrieben ist, als auch den Transport von Proteinen und Lipiden über Vesikel zur Vakuole zu koordinieren (Bright et al. 2005; Day et al. 2018). Das Endosom bei *S. cerevisiae* ist jedoch nicht direkt am autophagischen Abbauweg beteiligt, wie es bei Säugern durch das späte Endosom der Fall ist, sondern stellt lediglich Membranen und Proteine für die Bildung von Autophagosomen bereit.

1.2.2 Der Abbau von zellulären Bestandteilen durch die Autophagie

Ein wichtiges Qualitätskontrollsystem der Zelle stellt die Autophagie dar (Abbildung 2). Diese ist ein Teil des endosomalen Transports zum Recycling von zellulären Bestandteilen, Organellen und Proteinen. Es werden drei Arten der Autophagie unterschieden: Die Makroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA, *chaperon-mediated autophagy*) und die Mikroautophagie (Abbildung 2 A).

Die Chaperon-vermittelte Autophagie beschreibt das Erkennen von geschädigten Proteinen in Säugerzellen durch Chaperone, welche eine unterstützende Funktion innerhalb der Zelle

einnehmen und Transport zum Lysosom vermitteln. Im Lysosom erfolgt anschließend der Abbau der geschädigten Proteine (Cuervo und Wong 2014; Galluzzi et al. 2017). Die Mikroautophagie ist für Pilze, zum Beispiel *S. cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, beschrieben. Bei der Mikroautophagie kommt es zur Invagination der Vakuolenmembran, wodurch direkt zelluläre Komponenten in die Vakuole aufgenommen und anschließend abgebaut werden können (Kunz et al. 2004). Dies kann auch spezifisch für Organellen stattfinden, so ist die Ausbildung einer MIPA-Struktur (mikropexophagischer Membranapparat) für den Abbau von Peroxisomen bei *P. pastoris* beschrieben (Ano et al. 2005). Der dritte Bereich der Autophagie beschreibt die Makroautophagie, welche im Folgenden als „Autophagie“ bezeichnet wird. Dabei kommt es zur Bildung von sogenannten Autophagosomen, welche die abzubauenen zellulären Komponenten umhüllen und diese zur Vakuole (in Säugetierzellen zum Lysosom) transportieren. Dieser Vorgang kann sowohl nicht-selektiv stattfinden als auch selektiv. Die nicht-selektive Autophagie wird in der Literatur auch als „bulk“ (dt. Masse) oder generelle Autophagie bezeichnet. Dabei wird zufällig zytoplasmatische Material vom einem Autophagosom umschlossen und anschließend abgebaut (Yin et al. 2016). Untersuchungen zeigen, dass die Initiation dieser Form der Makroautophagie hauptsächlich bei Energie- und Nährstoffmangel stattfindet (Stipanuk 2009). Im Gegensatz dazu ist die selektive Form der Autophagieform zumeist als Qualitätskontrollmechanismus beschrieben (Knuppertz und Osiewacz 2016). In der selektiven Autophagie wird das abzubauenende Cargo spezifisch von Rezeptorproteinen erkannt, wodurch die Bildung der autophagosomalen Membran initiiert wird. Die jeweilige selektive Autophagie ist nach ihrem Cargo benannt: Mitophagie (Mitochondrien), Aggrephagie (Aggregierte Proteine), Xenophagie (Invasive Bakterien), Pexophagie (Peroxisomen), ER-Phagie (Endoplasmatisches Retikulum) und Nukleophagie (Zellkern) sind einige der beschriebenen Formen der selektiven Autophagie (Eine Auswahl ist in Abbildung 2 B dargestellt). Eine weitere Form der Autophagie beschreibt der Cytoplasma-zur-Vakuole-Transportweg (CVT, *cytoplasm-to-vacuole*), welcher bisher nur in *S. cerevisiae* beschrieben wurde und bei der Reifung von vakuolären Proteasen eine Rolle spielt (Yamasaki und Noda 2017).

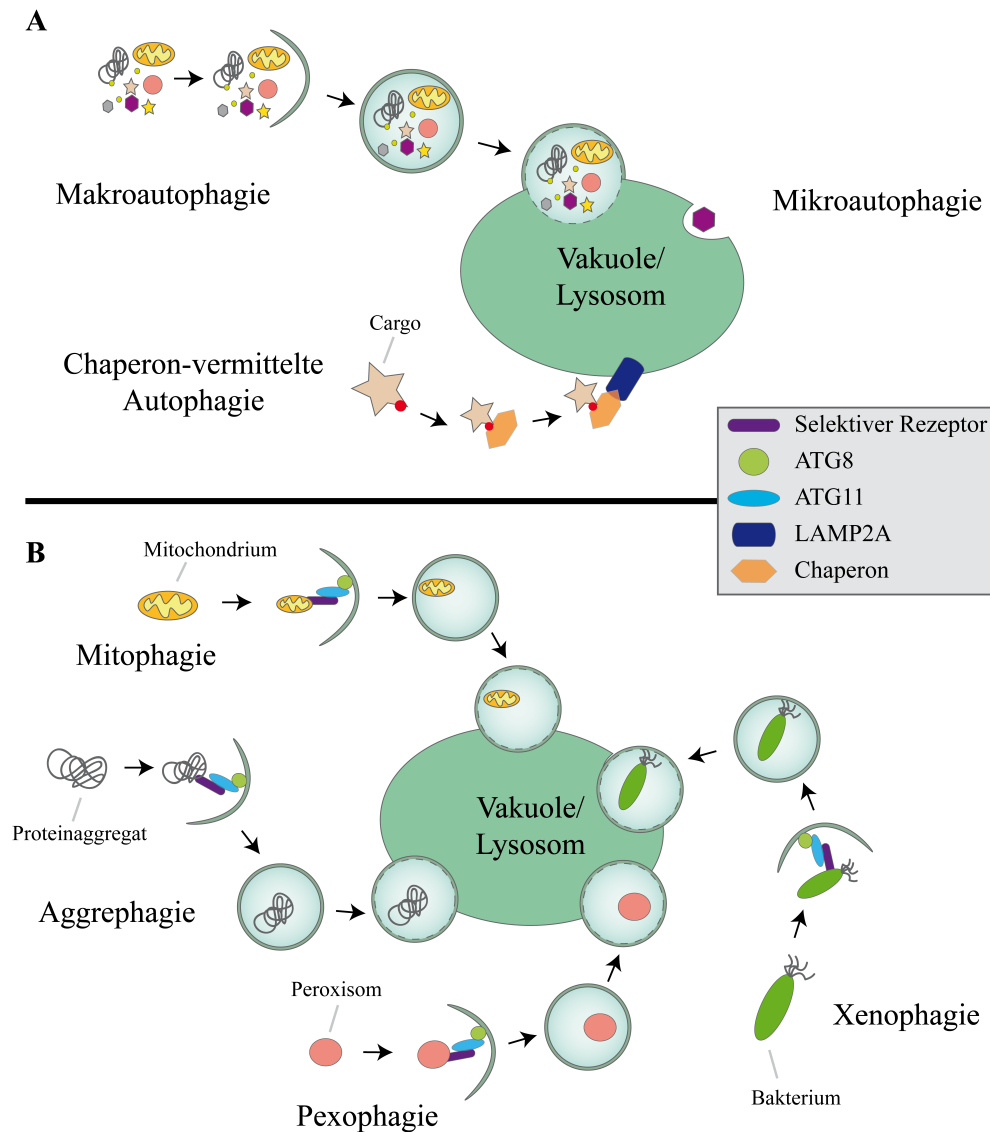


Abbildung 2: Betrachtung der verschiedenen Autophagieformen.

A Darstellung der drei Hauptformen der Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-abhängige Autophagie bei Säugern. **B** Ausgewählte Formen der selektiven Autophagie, welche zum Abbau von Mitochondrien (Mitophagie), Proteinaggregaten (Proteophagie), Peroxisomen (Pexophagie) und invasiven Bakterien (Xenophagie) führen. Quelle: Li und Kane (2009) und Wen und Klionsky (2016)

1.2.3 Der Lebenszyklus von Autophagosomen

Der autophagische Transportweg (im Folgenden dargestellt für Pilze) beschreibt einen Zyklus, der mit der Bildung von Autophagosomen beginnt, welche dann zur Vakuole (bei Säugerzellen entsprechend Lysosomen) transportiert werden und dort mit der Vakuolenmembran fusionieren. Anschließend erfolgt eine Rückgewinnung von Lipiden und Proteinen aus der vakuolären Membran, sodass erneut Autophagosomen gebildet werden können. In Abbildung 3 sind die einzelnen Schritte im Detail im gut untersuchten Modellorganismus *S. cerevisiae* dargestellt. Die Makroautophagie kann durch einen Nährstoffmangel ausgelöst werden. Dadurch kommt

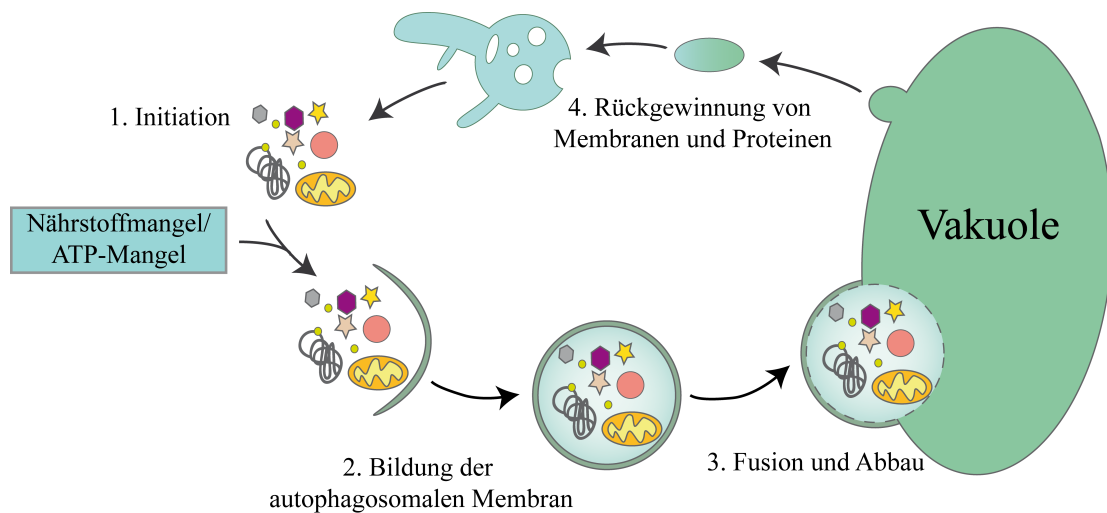


Abbildung 3: Lebenszyklus eines Autophagosoms.

Zunächst erfolgt die Initiation (1.) der Autophagie durch die Detektion eines Nährstoff- oder ATP-Mangels. Durch die Rekrutierung verschiedener Proteinkomplexe wird die autophagosomale Membran gebildet (2.) und das Autophagosom zur Vakuole transportiert. Es kommt zu einer Fusion der äußeren autophagosomalen Membran mit der Vakuole, wodurch der Inhalt des Autophagosoms in die Vakuole gelangt und abgebaut wird (3.). Die Proteine und Lipide der äußeren autophagosomalen Membran werden durch die Rückgewinnung (4.) recycelt und stehen nach dem Transport zum Endosom wieder zur Verfügung. Quelle: Suzuki und Emr (2018a) und Yin et al. (2016)

es in einem ersten Schritt zur Bildung von verschiedenen Proteinkomplexen. Durch das Zusammenspiel von Signalkaskaden werden zunächst die sogenannten prä-autophagosomalen Strukturen (PAS, auch Phagophor-Assemblierungsstelle) gebildet, welche die Grundstruktur zur Bildung des Autophagosoms darstellt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Erweiterung der Lipiddoppelmembran bis ein Vesikel entsteht. Dieses Vesikel wird als Autophagosom bezeichnet und ist in *S. cerevisiae* etwa 300 - 900 nm groß (Baba et al. 1997). An der Autophagie ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. Zur Vereinfachung werden die beteiligten Proteine und die jeweiligen Gene als ATG-Proteine/Gene (Autophagie) bezeichnet. Aktuell wurden 43 dieser Proteine in *S. cerevisiae* beschrieben, welche eine mit der Autophagie-assoziierte Funktion aufweisen (Fukuda und Kanki 2021). Neben diesen Hauptkomponenten der Autophagie gibt es jedoch viele weitere Proteine, welche an den verschiedenen Schritten des autophagischen Abbauweges beteiligt sind. Im folgenden Abschnitt wird der Lebenszyklus der Autophagosomen mit den jeweils beteiligten Proteinkomplexen genauer betrachtet.

1.2.3.1 Initiation der Autophagosomenbildung

Die nicht-selektive Autophagie ist ein zellulärer Mechanismus, welcher bei Energie- oder Nährstoffmangel initiiert wird. Ein wichtiger zellulärer Sensor stellt die TOR-Kinase (*target*

of rapamycin) dar. Diese ist bei Normalbedingungen aktiv und phosphoryliert unter anderem das Autophagie-Protein ATG13, wodurch das Protein inhibiert wird (Abbildung 4). Kommt es zu einer Nährstoffmangelsituation, wird TOR inhibiert und ATG13 aktiv. Dies führt dazu, dass ATG13 mit ATG1 und dem ATG17-ATG29-ATG31-Komplex den Initiationskomplex der Autophagosomenbildung bildet, den sogenannten ATG1-Kinase-Komplex (Mizushima 2010). ATG1 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und das erste Autophagie-Protein, welches beschrieben wurde (Matsuura et al. 1997; Tsukada und Ohsumi 1993).

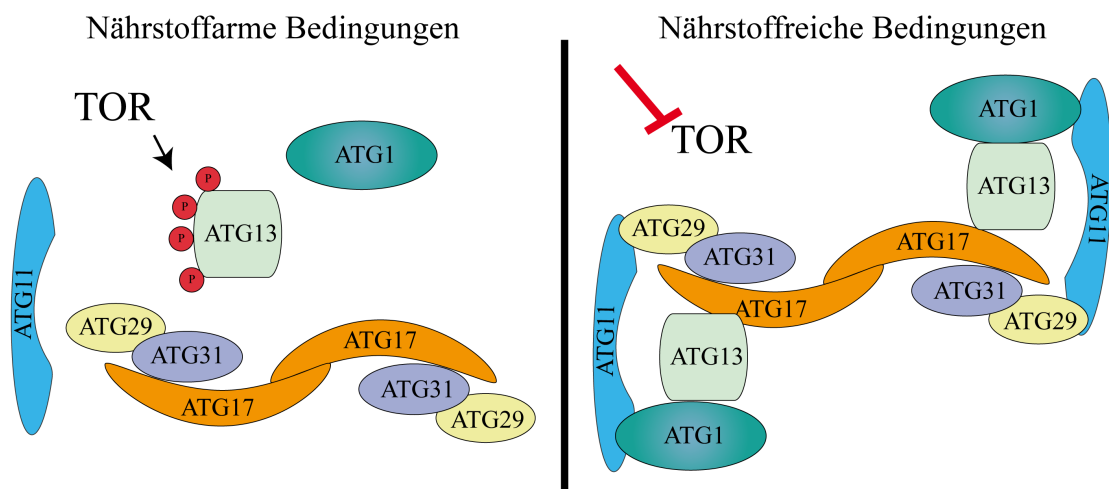


Abbildung 4: Aufbau des ATG1-Komplexes.

Bei Nährstoffmangelbedingungen kommt es zu einer aktiven TOR-Kinase, welche ATG13 phosphoryliert (rot) und keine Autophagie induziert wird. Bei Nährstoffmangel wird TOR inhibiert und es kommt zur Assemblierung des ATG1-Komplexes, wodurch die Bildung von Autophagosomen initiiert wird. Der ATG1-Komplex besteht aus den Proteinen ATG1, ATG13, ATG17 und dem Subkomplex ATG31-ATG19.

Quelle: Modifiziert nach Kabeya et al. (2005), Matscheko et al. (2019) und Reggiori et al. (2004)

Dabei ist ATG17 ein großes, S-förmiges Protein, welches mit dem N-Terminus von ATG13 interagiert (Kabeya et al. 2005). Innerhalb des ATG17-ATG29-ATG31-Subkomplexes erfolgt die Interaktion von ATG17 mit ATG31, welches zusätzlich mit ATG29 interagiert. Untersuchungen zeigen, dass auch im Bereich der nicht-selektiven Autophagie das Gerüstprotein ATG11 mit ATG29 und ATG1 interagiert, möglicherweise zur Stabilisierung des Proteinkomplexes und zur Rekrutierung und Interaktion mit weiteren Proteinen. Obwohl ATG17 somit ein zentrales Protein des Autophagie-Initiierungskomplexes darstellt, zeigen Untersuchungen, dass auch in ATG17-Deletionsmutanten weiterhin Autophagie stattfinden kann. Darauf basierend wird angenommen, dass der Verlust von ATG17 durch ATG11 kompensiert werden kann (Baba et al. 1997; Suzuki et al. 2007). Neueste Untersuchungen in *S. pombe* zeigen, dass ATG11

die Kinase ATG1 aktiviert und somit auch im Bereich der nicht-selektiven Autophagie eine Bedeutung hat (Pan und Du 2020; Pan et al. 2020). In Untersuchungen zu ATG13 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein über die N-Terminale HORMA-Domäne in der Lage ist mit PIP3 (Phosphoinositol-3-Phosphat) zu interagieren, wodurch eine Interaktion mit ATG14, einer PIP3-Kinase möglich ist (Jao et al. 2013). Ebenfalls über diese HORMA-Domäne ist eine Interaktion mit ATG9 möglich, das einzige bisher bekannte Autophagie-assoziierte Transmembranprotein, welches eine bedeutende Rolle für die Bildung und Elongation des PAS hat (Reggiori et al. 2004).

1.2.3.2 Ausbildung der autophagosomalen Membran

Die Bildung eines Autophagosomes erfolgt an der Phagophor-Assemblierungsstelle PAS. Nach Ausbildung des Phagophors erfolgt die Erweiterung der autophagosomalen Membran zu einem vollständigen Autophagosom, das durch eine Doppelmembran gekennzeichnet ist. Dabei ist die Herkunft der Membranen nicht vollständig geklärt und neben der Herkunft der Lipide aus dem ER gibt es auch Hinweise auf Mitochondrien und Peroxisomen als Membranquelle (Eskelinen 2019). Für die Bildung des PAS, und der anschließenden Elongation der autophagosomalen Doppelmembran, sind verschiedene Proteinkomplexe nötig, welche im Folgenden beschrieben werden und in Abbildung 5 dargestellt sind.

ATG9-Komplex

ATG9 hat eine besondere Bedeutung bei der Autophagosomenbildung, da es als einziges Transmembranprotein im Mittelpunkt des Aufbaus der autophagosomalen Membran steht (Lang et al. 2000; Noda et al. 2000; Young et al. 2006). Unter Normalbedingungen liegt ATG9 sowohl diffus in der Zelle vor, als auch in ATG9-Strukturen, bei denen eine Anzahl von 24-32 der ATG9-Proteine in Einzelmembran-Vesikeln lokalisiert sind (Noda et al. 2000; Reggiori et al. 2004; Yamamoto et al. 2012). Ältere Untersuchungen zeigten, dass ATG9 zwischen Mitochondrien und dem PAS zirkuliert, allerdings konnte in neueren Untersuchungen keine Assoziation von ATG9 mit zellulären Kompartimenten, wie dem Endosom, Mitochondrien oder dem Golgi-Apparat, festgestellt werden (Ohashi und Munro 2010; Reggiori et al. 2005; Sekito et al. 2009; Yamamoto et al. 2012). Nährstoffmangelbedingungen führen zu einer

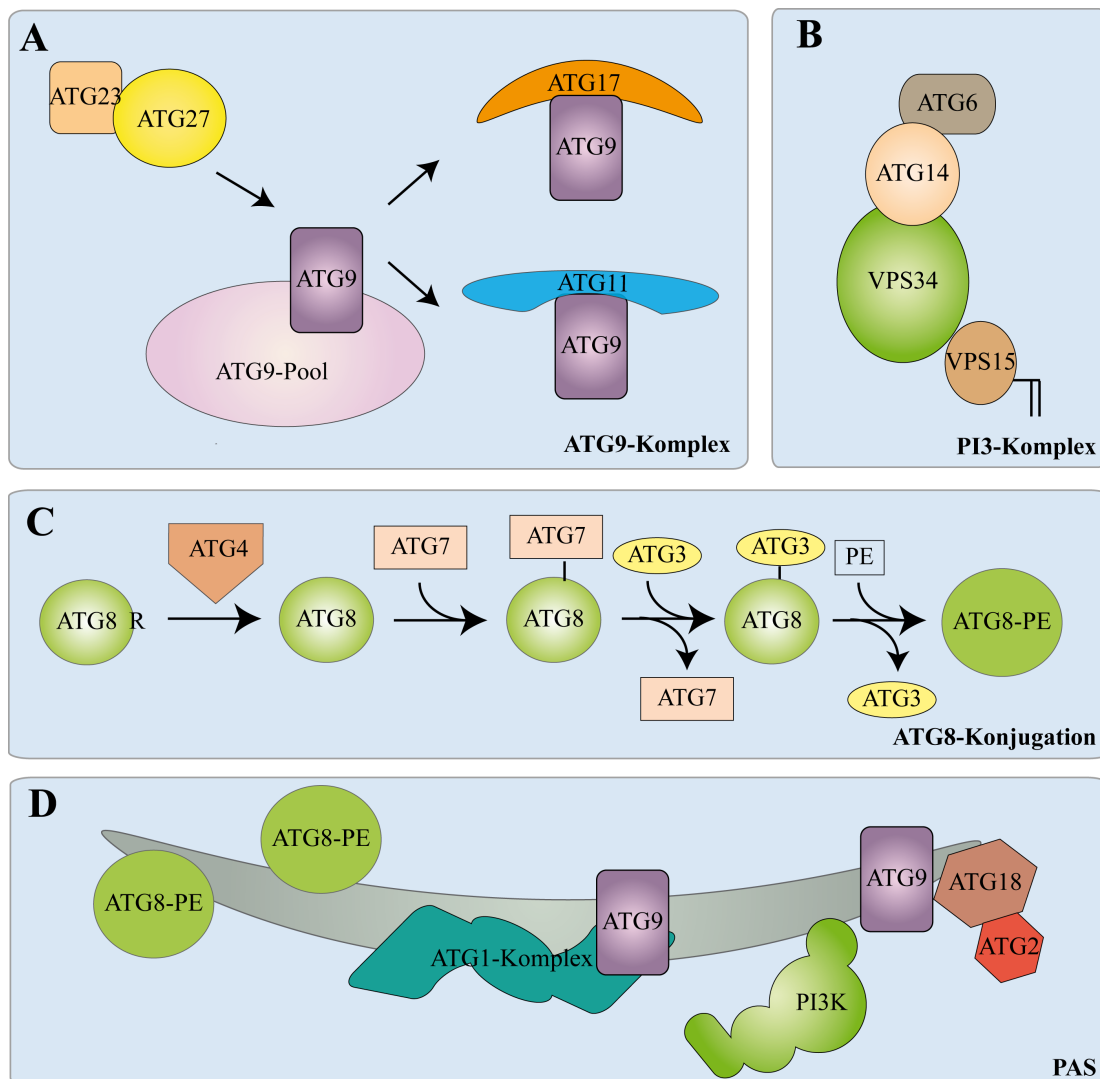


Abbildung 5: Proteine und Komplexe der Bildung der Autophagosomenmembran.

A Unter Normalbedingungen befindet sich ATG9 durch den Subkomplex ATG23-ATG27 in Vesikeln und bildet so den ATG9-Pool. Bei Autophagieinduktion erfolgt eine Interaktion mit ATG17 (nicht-selektive Autophagie) oder ATG11 (selektive Autophagie) und Rekrutierung zum PAS. **B** Der PI3-Komplex besteht aus den Proteinen ATG6, ATG14, VPS34 und VPS15 und phosphoryliert Phosphoinositol zu Phosphoinositol-3-Phosphat. **C** Lipidierung von ATG8 mit Phosphoethanolamin (PE) durch ATG4, ATG7 und ATG3. **D** Die Proteinkomplexe am PAS bei der Bildung der autophagosomalen Membran.

Quelle: Wen und Klionsky (2016)

Verschiebung der ATG9-Vorkommen und es werden vermehrt ATG9-Vesikel *de novo* gebildet. Dies geschieht unter anderem auch durch eine Erhöhung der *Atg9*-Expression (Mari et al. 2010; Ohashi und Munro 2010; Yamamoto et al. 2012). Der ATG9-Pool wird durch die Proteine ATG23-ATG27 aufrecht erhalten (Abbildung 5 A) und der Verlust dieser Proteine führt zu einer ATG9-Misslokalisierung (Backues et al. 2015). In einer ATG11-Überexpressionsmutante kommt es hingegen zu einer verstärkten ATG9-Lokalisation am PAS (Backues et al. 2015). ATG9 ist in der Lage sowohl mit ATG11, als auch mit ATG17 zu interagieren (Matscheko et al. 2019; Sekito et al. 2009). Diese beiden Proteine konkurrieren um die Interaktion mit ATG9, sodass

davon ausgegangen werden kann, dass die ATG17-Interaktion im Fall der nicht-selektiven Autophagie vorliegt, während es nach Induktion der selektiven Autophagie zur Rekrutierung von ATG9 zum PAS durch ATG11 kommt (Matscheko et al. 2019; Sekito et al. 2009).

PI3-Komplex

Für die Bildung der autophagosomalen Membran spielen Phosphoinositole eine bedeutende Rolle. Es wurde gezeigt, dass der ATG1-Kinase-Komplex (Abbildung 4) mit ATG14 interagiert, ein Protein des Phosphatidylinositol-3-Kinase Komplexes I (PI3K, Abbildung 5 B) (Obara et al. 2006). Eine der Hauptaufgaben dieses Komplexes ist die Phosphorylierung von Proteinen des Phagophors. ATG14 interagiert mit VPS34, einer PI3-Kinase, welche wiederum von VPS15 reguliert wird, eines weiteren Proteins dieses Komplexes (Itakura et al. 2008). VPS34 phosphoryliert im aktivierten Zustand Phosphoinositol (PI) zu PI3P in der sich bildenden autophagosomalen Membran. Dieses Signallipid wiederum rekrutiert ATG18 und ATG21 zur PAS-Membran. Während ATG21 primär ein Faktor der selektiven Autophagie darstellt, ist ATG18 bei allen Autophagiearten relevant und kooperiert mit ATG2, um den ATG9-Zyklus aufrecht zu erhalten (Reggiori et al. 2004; Strømhaug et al. 2004; Wang et al. 2001).

ATG8-Lipidierung

Eine Schlüsselkomponente der Autophagosomenmembran ist das ubiquitin-ähnliche Protein ATG8, welches bei der Bildung und Elongation der Autophagosomenmembran über einen C-terminalen Phosphoethanolamin-Anker (ATG8-PE) in die sich bildende Lipiddoppelmembran am PAS eingebaut wird (Kirisako et al. 1999, 2000). Die Lipidierung von ATG8, und der Einbau in die sich ausbildende autophagosomale Membran, ist in *S. cerevisiae* und weiteren Modellorganismen essenziell zur Autophagosomenbildung (Kirisako et al. 2000). Die Verknüpfung von ATG8 mit PE erfolgt durch eine Abfolge von Proteininteraktionen (Abbildung 5 C). Nach der Synthese von ATG8 wird zunächst das C-terminale Arginin durch die Cystein-Protease ATG4 abgespalten, wodurch ein Glycin verbleibt (Ichimura et al. 2000). Im nächsten Schritt wird ATG7 mit ATG8 verknüpft und somit für das E2-Enzym ATG3 aktiviert, welches dann PE an das Glycin am C-Terminus knüpft (Ichimura et al. 2000). Hierdurch kann ATG8 über den Lipidanker in die autophagosomale Membran eingebaut werden.

PAS

Am PAS kommen die zuvor beschriebenen Proteine und Proteinkomplexe zusammen (Abbildung 5 D). Zwei weitere essenzielle Proteine des PAS stellen ATG18 und ATG2 dar, welche einen Subkomplex bilden (Barth et al. 2001; Dove et al. 2004). Dabei interagiert ATG2 mit ATG18, welches als Phosphoinositol-bindendes Protein beim Aufbau der autophagosomalen Membran beteiligt ist. Der ATG2-ATG18-Proteinkomplex ist am Randbereich des PAS lokalisiert und koordiniert die ATG9-Lokalisation (Dove et al. 2004; Kotani et al. 2018; Shintani et al. 2001; Wang et al. 2001). Nachdem die komplette autophagosomale Membran ausgebildet ist, kommt es zu einem Zusammenschluss der Membranen und ein vollständiges Autophagosom liegt vor. Dieses wird anschließend zur Fusion mit der Vakuole für den Abbau transportiert.

1.2.3.3 Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole

Die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole erfolgt mit Hilfe der sogenannten SNARE-Proteine. Dabei müssen zunächst die SNARE-Proteine zum Autophagosom rekrutiert und auch aktiviert werden (Abbildung 6).

Unter SNARE-Proteinen (löslicher N-Ethylmaleimid-empfindlicher Faktor-Anheftungsprotein-Rezeptor, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) versteht man Membranproteine, welche kanonische Heptad-Repeat-Domänen (SNARE-Motiv) mit einem zentralen Argininy- (R) oder Glutaminy- (Q) Rest besitzen. Darauf basierend unterscheidet man R- und Q-SNARE-Proteine. Die Komplexe der SNAREs sind aus Vier-Helix-Bündeln aufgebaut, welche jeweils aus drei Q-SNARE-Proteinen, sowie einem R-SNARE bestehen (Fasshauer et al. 1998; Wickner und Rizo 2017). Die SNARE-Proteine sind an Membranen verankert, welche fusioniert werden sollen. Dabei müssen zunächst die Membranen in eine räumliche Nähe zueinander gebracht werden, bevor es zu einer Interaktion der SNARE-Proteine der gegenüberliegenden Membranen kommt. Durch die Entfaltung der SNARE-Domänen bei der Aktivierung der SNARE-Proteine kommt es zu einer Deformation der Lipiddoppelschicht der Membran mit einer Lipidumlagerung, wodurch die Membranfusion erfolgt.

Die Aktivierung von SNARE-Proteinen ist strikt reguliert und erfolgt durch GTPasen, welche in einer inaktiven GDP- oder aktiven GTP-gebundenen Form vorliegen. Bei der Rekrutierung zu den Membranen werden die GTPasen durch spezifische GEFs (*guanine exchange factors*) aktiviert. Nach Bildung des Autophagosoms, kommt es zur Interaktion von ATG8 mit CCZ1, welches mit MON1 den MON1-CCZ1-Komplex bildet. Dieser Komplex ist ein GEF für die GTPase YPT7

(Gao et al. 2018; Nordmann et al. 2010; Schimmöller und Riezman 1993; Wang et al. 2002). Verstärkt wird die Rekrutierung von MON1-CCZ1 zur autophagosomalen Membran durch PI3P, welches auch eine Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von YPT7 hat (Bas et al. 2018; Cabrera et al. 2014; Wang et al. 2003). YPT7 interagiert mit VPS39 des HOPS-Komplexes (*homotypic fusion and protein sorting*), wodurch dieser zum Autophagosom rekrutiert wird (Chen et al. 2014; Scott et al. 1997; Seals et al. 2000; Wurmser et al. 2000).

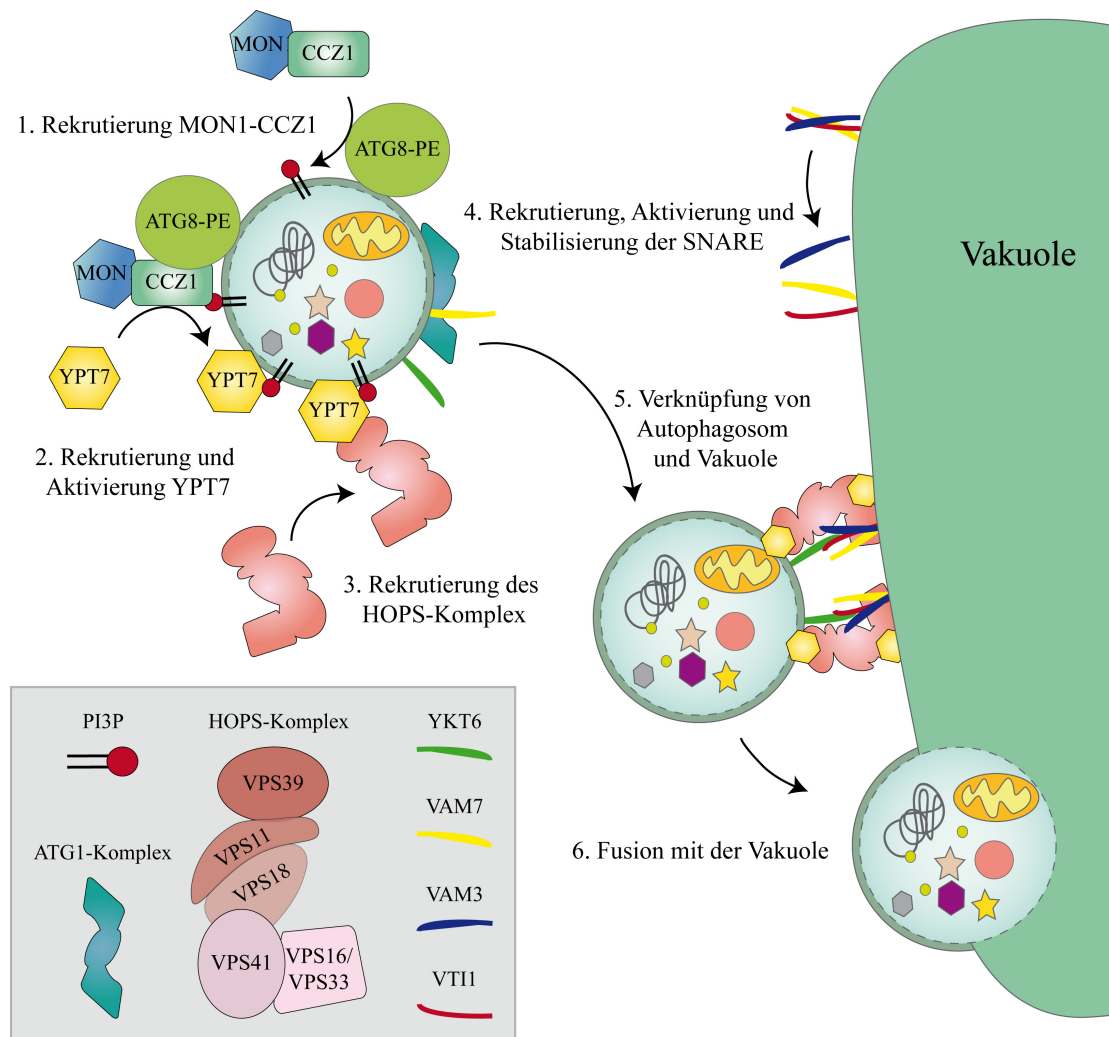


Abbildung 6: Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole.

Zunächst erfolgt die Rekrutierung des MON1-CCZ1-Komplexes (1.) an der autophagosomalen Membran. Hierdurch kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von YPT7 (2.), wodurch der HOPS-Komplex an das Autophagosom assoziiert (3.). Nach der Rekrutierung und Aktivierung der SNARE-Proteinkomplexe an die Autophagosomen- und Vakuolenmembran (4.) erfolgt die Verknüpfung des Autophagosoms mit der Vakuole (5.) und es kommt zur Fusion der Membranen (6.) Quelle: Erstellt nach Daten von Langemeyer et al. (2018) und Yang und Klionsky (2009)

Der HOPS-Komplex stabilisiert die Anlagerung und Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole und interagiert auch direkt mit den beteiligten SNARE-Proteinen (Eitzen et al. 2000; Krämer und Ungermann 2011; Lürick et al. 2015; Rieder und Emr 1997). Neben VPS39 enthält der

HOPS-Komplex die Proteine VPS11 und VPS18, welche ein Proteinrückgrat bilden und an der Vakuolen zugewandten Seite des Komplexes befinden sich der Subkomplex VPS16/VPS33, sowie VPS41 (Dulić und Riezman 1990; Wurmser et al. 2000). Dabei interagiert der Subkomplex VPS16/VPS33 mit den vakuolären SNARE-Proteinen, während VPS41 in der Lage ist mit YPT7 zu interagieren, welches auch in der Vakuolenmembran lokalisiert ist (Balderhaar et al. 2010; Haas et al. 1995; Lürick et al. 2017, 2015; Sato et al. 2000; Seals et al. 2000). Die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole wird durch den HOPS-Komplex unterstützt. Dafür sind die beteiligten SNARE-Proteine essenziell. Untersuchungen zu Mutanten der vakuolären SNARE-Proteine zeigen hingegen eine Akkumulation von Autophagosomen (Darsow et al. 1997; Ishihara et al. 2001; Sato et al. 1998).

Für die Autophagosom-Vakuolen-Fusion wurden vier beteiligte SNARE-Proteine identifiziert. Dabei handelt es sich um das autophagosomale R-SNARE-Protein YKT6 und die drei vakuolär lokalisierten Q-SNARE-Proteine VAM3, VAM7 und VTI1 (Bas et al. 2018; Darsow et al. 1997; Fischer von Mollard und Stevens 1999; Harding et al. 1995; Ishihara et al. 2001; Nordmann et al. 2010). Neueste Untersuchungen zeigen, dass YKT6 bereits in einem frühen Stadium zum Autophagosom durch einen Proteinkomplex des ER und COPII-bedeckte Vesikel rekrutiert wird (Barz et al. 2020; Bas et al. 2018; Gao et al. 2020). Dabei wird YKT6 durch eine ATG1-abhängige Phosphorylierung inaktiviert um eine vorzeitige Autophagosomen-Vakuolen-Fusion zu verhindern (Barz et al. 2020; Gao et al. 2020). VAM7 ist ein SNARE-Protein der Vakuole, jedoch kommt es durch eine Interaktion von ATG17 mit VAM7 auch zu einer Rekrutierung dieses SNARE-Proteins zum PAS, ein essenzieller Vorgang der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion (Liu et al. 2016). Bisher ungeklärt ist, wie nach Fertigstellung des Autophagosoms die Dissoziation von ATG17 und VAM7, sowie der anschließende Übergang zur Lokalisation von VAM7 in der vakuolären Membran verläuft (Liu et al. 2016). Nach Fusion der Vakuolenmembran mit der äußeren Membran des Autophagosoms gelangt der Inhalt des Autophagosoms in die Vakuole und es kommt zum Abbau und Recycling der Proteine und Lipide durch die vakuolären Proteasen.

1.2.3.4 Rückgewinnung aus der Vakuolenmembran

Nach der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion mit der Vakuole wird der Inhalt des Autophagosoms durch die vakuolären Proteasen degradiert. Daher wird die Vakuole zumeist als Endpunkt des autophagosomalen Transportwegs angesehen und nur wenige Untersuchungen beschäftigten sich bisher mit der Rückgewinnung von Proteinen und Lipiden aus der Vakuolenmembran. Dabei beteiligt sind Proteine, die dem Retromer-Komplex und den sortierenden Nexinen zugeordnet sind (Arlt et al. 2015; Ma et al. 2017; Suzuki und Emr 2018a).

Sortierende Nexine sind an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt, wie dem vesikulären Transport, der Verteilung von Membran und Proteinen innerhalb der Zelle (Haft et al. 1998; Leprince et al. 2003; Nice et al. 2002). Diese Proteine enthalten eine evolutionär konservierte Phosphoinositol-bindende PX-Domäne (von *phox*, *phagocyte NADPH oxidase*), wodurch eine Assoziation mit endosomalen Membranen ermöglicht wird (Burda et al. 2002; Gallon und Cullen 2015). In Abhängigkeit ihrer Domänenstruktur werden die SNX-Proteine in Unterfamilien eingeteilt. Dabei enthält das Protein entweder nur eine PX-Domäne, eine PX- und FERM-Domäne (Protein 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin), oder eine BAR-Domäne (Bin/Amphiphysin/Rvs), welche eine Membrankrümmung bewirken kann (Chi et al. 2015; Cullen 2008; Gallon und Cullen 2015; van Weering et al. 2012a,b).

Nach bisherigen Untersuchungen konnte die Rückgewinnung von zwei Proteinen aus der vakuolären Membran nachgewiesen werden. Zum einen das Recycling von ATG27 durch das sortierende Nexin ATG24 (auch SNX4 genannt), zum anderen erfolgt eine Rückgewinnung von PEP1 (auch VPS10 genannt), ein Transmembranrezeptorprotein vieler vakuolärer Hydrolasen (Arlt et al. 2015; Jørgensen et al. 1999; Marcusson et al. 1994; Suzuki und Emr 2018a; Westphal et al. 1996). Das Recycling von PEP1 geschieht durch den Retromer-Komplex, sowie dem Dynamin-ähnlichen Protein VPS1 und die GTPase YPT7, welche auch für die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole relevant ist (Abbildung 6) (Arlt et al. 2015; Balderhaar et al. 2010; Liu et al. 2012). Während dieses Vorgangs verbleibt YPT7 an der Vakuole, während VPS1 und der Retromer-Komplex mit dem Cargo dissoziieren (Arlt et al. 2015). Der Retromer-Komplex stellt ein wichtigen Proteinkomplex des endosomalen Transports dar, durch welchen über 100 Membranproteine innerhalb der Zelle sortiert werden (Steinberg et al. 2013). Der Retromer-Komplex besteht aus fünf Proteinen, welche in zwei Subkomplexen vorliegen. Der eine Subkomplex besteht aus den sortierenden Nexinen VPS5-VPS17, welche als SNX-BAR-Proteine an der Abschnürung des Cargos von der vakuolären Membranen beteiligt sind (Arlt et al. 2015; Liu et al. 2012). Der zweite Subkomplex des Retromers dient zur

Erkennung des Cargos und besteht aus den Proteinen VPS26, VPS29 und VPS35, wobei letzteres die zentrale Untereinheit darstellt und mit der GTPase YPT7 interagiert (Balderhaar et al. 2010; Hierro et al. 2007; Liu et al. 2012; Seaman et al. 1998).

Das Recycling von ATG27 ist wichtig für den autophagischen Transport (Suzuki und Emr 2018a,b). Dieses Transmembranprotein ist, wie bereits in Abschnitt 1.2.3.2 beschrieben, an der Aufrechterhaltung des ATG9-Pools beteiligt und zirkuliert zwischen dem Golgi-Apparat, der Vakuole und dem Endosom (Backues et al. 2015; He et al. 2006; Segarra et al. 2015; Suzuki und Emr 2018a; Yamamoto et al. 2012; Yen et al. 2007). Der Verlust von ATG24 führt zu einer Akkumulation von ATG27 an der Vakuolenmembran, wodurch die Autophagie beeinträchtigt wird (Ma et al. 2017, 2018; Suzuki und Emr 2018a). In einer Arbeit von Suzuki und Emr (2018a) konnte gezeigt werden, dass ATG24 eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von ATG27 aus der vakuolären Membran spielt. Das Recycling erfolgt in einem zwei-Schritt-Verfahren, bei dem zunächst ATG27 durch ATG24 aus der Vakuole zum Endosom transportiert wird und anschließend vom Endosom zum Golgi-Apparat durch den Retromer-Komplex, welcher ebenfalls von ATG24 unterstützt wird (Ma et al. 2017, 2018; Suzuki und Emr 2018a). ATG24 ist ein sortierendes Nexin, dessen Funktion in humanen Zellen hauptsächlich im Bereich des endosomalen Sortiervorgangs beschrieben ist, aber in verschiedenen Pilzen und *Trypanosoma brucei* auch im Bereich der selektiven Autophagie beteiligt ist (Ano et al. 2005; Brennand et al. 2015; Haft et al. 1998; He et al. 2013; Leprince et al. 2003; Nice et al. 2002; Traer et al. 2007; van Weering et al. 2012a; Zhao et al. 2016; Zheng et al. 2018). Obwohl sich einige Studien mit der Beteiligung von ATG24 an der selektiven Autophagie befassen, konnte die exakte Funktion noch nicht abschließend geklärt werden. Eine der am besten untersuchten Formen der selektiven Autophagie stellt die Mitophagie da, welche den spezifischen Abbau von Mitochondrien beschreibt. Auch bei dieser Mitophagieform wurde eine Beteiligung von ATG24 bereits zuvor festgestellt (He et al. 2013; Nice et al. 2002; Zhao et al. 2016).

1.2.4 Die Mitophagie

Während bei der nicht-selektiven Autophagie unspezifisch zelluläre Komponenten von einem Autophagosom umschlossen und abgebaut werden, handelt es sich bei der selektiven Autophagie um einen spezifischen regulatorischen Mechanismus. Die selektive Autophagie

von Mitochondrien wird als Mitophagie bezeichnet und dient der Zelle zur Kontrolle der Quantität und Qualität dieser Organellen (Lemasters 2005; Priault et al. 2005). Eine der Hauptkomponenten der Mitophagie stellt in *S. cerevisiae* ScATG32 dar, welches als Mitophagierezeptorprotein durch die Rekrutierung von ScATG8 über ein ATG8-interagierendes Motif (AIM) die abzubauenen Mitochondrien an das PAS vermittelt (Kanki et al. 2009; Kondo-Okamoto et al. 2012; Okamoto et al. 2009).

ScATG32 ist an der mitochondrialen Membran lokalisiert und wird durch einen Proteinkomplex, bestehend aus der Proteinphosphatase ScPPG1 und dem Far-Komplex, negativ reguliert (Furukawa et al. 2018). Während unter Normalbedingungen eine De-phosphorylierung von ScATG32 durch diesen Komplex erfolgt, führt die Initiation der Mitophagie zu einer Inhibierung des ScPPG1/Far-Komplexes (Furukawa et al. 2018). Anschließend kommt es zur Phosphorylierung von Serin-114 und Serin-119 von ScATG32 durch die Casein-Kinase 2 (ScCK2) (Aoki et al. 2011; Kanki et al. 2013). Durch die Phosphorylierung von ScCK2, vor allem an Serin-114, erfolgt die Interaktion von ScATG32 mit dem N-Terminus des Adapterproteins ScATG11 (Aoki et al. 2011). Die ScATG32-ScATG11-Interaktion ist der erste Schritt zur Rekrutierung der Autophagiemaschinerie und der Bildung eines Autophagosoms um das abzubauenende Mitochondrium. Bei dieser Interaktion erfolgt die Aktivierung von ScATG11, indem ScATG32 die Dimerisierung von ScATG11 induziert (Matscheko et al. 2019). In *S. cerevisiae* wird die Interaktion des mitochondrialen Rezeptorproteins ScATG32 mit dem autophagosomalen Protein ScATG8 durch ScATG11 vermittelt. ATG11 wird, neben seiner Funktion als Adapterprotein bei der Vermittlung von ATG32 und ATG8, auch als „Gerüstprotein“ bezeichnet und ist charakterisiert durch seine sogenannten „coiled-coil“ Strukturen (Zientara-Rytter und Subramani 2020). Diese enthalten verschiedene Protein-Interaktionsmotive, wodurch Interaktionen mit einer Vielzahl von Autophagie-relevanten Proteinen wie ATG1, ATG9, ATG17 und ATG20 möglich sind. Durch diesen Aufbau ist ScATG11 in *S. cerevisiae* auch ein wichtiger Faktor des ScATG1-Komplexes, welcher die Proteinassamblierung zum Aufbau des PAS koordiniert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Verlust von ScATG11 zu keiner Beeinträchtigung der nicht-selektiven Autophagie führt, während die selektive Autophagie, wie zum Beispiel die Mitophagie, vermindert vorliegt (He et al. 2006; Kim et al. 2001; Mao et al. 2013; Shintani und Klionsky 2004).

ScATG11 ist in der Lage ScATG9-Vesikel zu binden und es kommt zur Bildung des PAS. Des Weiteren zeigen Untersuchungen, dass ATG11 die Rekrutierung von ATG1, ATG2, ATG8 und ATG20 initiiert (Shintani und Klionsky 2004; Suzuki et al. 2007). Da diese Komponenten sowohl im Fall der nicht-selektiven, als auch in der selektiven Autophagie beteiligt sind, ist die strikte Regulation der Proteininteraktionen und -rekrutierung entscheidend für den Ablauf der einen, bzw. der anderen Form der Autophagie.

Neben der Mitophagie sind in anderen Organismen auch Autophagosomen-unabhängige Mechanismen beschrieben. Einer davon sind die sogenannten MDVs (*mitochondrial-derived vesicles*), welche bisher in *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* und auch in *S. cerevisiae* identifiziert werden konnten (Hughes et al. 2016; McLelland et al. 2014; Neuspiel et al. 2008; Soubannier et al. 2012a; Yamashita et al. 2016). Dabei handelt es sich um kleine Vesikel, welche oxidierte mitochondriale Proteine und Lipide enthalten, die durch Mikromitophagie in die Vakuole gelangen und dort abgebaut werden können (Soubannier et al. 2012a,b). Dieser Abbauweg von Mitochondrien ist noch wenig untersucht und es bleiben viele Fragen zur Induktion der MDVs und zum Ablauf des Vesikeltransports offen. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um eine ATG8-unabhängige Form der Mitophagie handelt.

1.2.5 Eine evolutionsbiologische Betrachtung der Autophagie

Es stellt sich für Forscher immer wieder die Frage, inwiefern die Ergebnisse von Modellorganismen auf andere Organismen übertragbar sind. Es hat sich gezeigt, dass zum Beispiel das erwähnte ScATG32 ein sehr spezifisches Protein darstellt, welches nur in Hefe und einigen anderen Pilzen vorkommt (Kanki et al. 2009; Okamoto et al. 2009). Bisher konnte kein derart spezifisches Mitophagierezeptorprotein in anderen Organismen identifiziert werden. Dennoch scheint der Ablauf der nicht-selektiven Autophagie evolutionär konserviert zu sein. In menschlichen Neuronalzellen konnte der Pink/Parkin-Signalweg identifiziert werden, welcher bedeutend für die Mitophagie in diesen Zellen ist (Kondapalli et al. 2012). Eine Beeinträchtigung der Mitophagie in Neuronen führt in der Konsequenz zu starken kognitiven Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder das Parkinson-Syndrom, welche, wie zuvor beschrieben, auch mit dem Alterungsprozess assoziiert sind (Abschnitt 1.1.3).

PINK1 ist eine Serin/Threonin Kinase, welche in funktionalen Mitochondrien in

die mitochondriale Matrix transportiert und dort degradiert wird. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einer Akkumulation von PINK1 an der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch es die aktivierende Phosphorylierung der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (PRKN/PARK2) katalysiert (Kondapalli et al. 2012). Dies führt zu einer Polyubiquitinylierung von Proteinen der äußeren mitochondrialen Membran, wodurch Rezeptorproteine wie SQSTM1 und OPTN rekrutiert werden, welche im Fall der Makroautophagie durch Interaktion mit LC3 (das humane Homolog zu ATG8) das abzubauenende Mitochondrium mit dem sich bildenden Phagophor des Autophagosoms verbinden (Geisler et al. 2010; Kondapalli et al. 2012).

Untersuchungen in *Schizosaccharomyces pombe* zeigten, dass der ATG1-Komplex der Hefe dem ATG1-Komplex des Menschen ähnelt (Nanji et al. 2017). Dies deutet darauf hin, dass im Laufe der Evolution eine Komplexierung der Autophagie stattgefunden hat. Dabei scheint der grundlegende Mechanismus konserviert zu sein, während die einzelnen Komponenten verändert sein können. Auch die Betrachtung von ATG8 von *S. cerevisiae* im Vergleich zu Säugern, wo verschiedenen Formen von LC3 und GABARAB vorliegen, zeigt, dass es die Autophagie ein komplexer Mechanismus ist und vor allem in höheren Lebewesen eine strikte spatio-temporale Regulation nötig ist (Lee und Lee 2016).

Um die selektive Autophagie der Mitochondrien besser verstehen zu können, wird versucht durch Komplementationsexperimente mögliche Mitophagierezeptorproteine zu identifizieren. Eine solche Untersuchung wurde in *Magnaporthe oryzae* durchgeführt. In diesem pflanzenpathogenen Pilz führte der Verlust von MoATG24 zu einer Beeinträchtigung der Mitophagie (He et al. 2013). Dieser Mitophagiedefekt konnte durch das Einbringen von *ScAtg32* aus *S. cerevisiae* komplementiert werden. Dies veranlasste die Autoren zu der Hypothese, dass ATG24 ein mögliches Funktionshomolog zu ATG32 darstellt.

ATG24/SNX4 - Ein möglicher Mitophagierezeptor?

Die Erstbeschreibung von ATG24 erfolgte als Komponente des *cvt*-Signalweges (Nice et al. 2002). Anschließend wurde ATG24 in humanen Zellen als sortierendes Nexin im Bereich des zellulären Sortierens beschrieben, weshalb bei Säugern dieses Protein als SNX4 bezeichnet (Traer et al. 2007; van Weering et al. 2012a,b).

Um die Funktion von ATG24 zu erforschen, wurde mit Hilfe von pilzlichen Modellen der Einfluss von ATG24 auf die selektiven Formen der Autophagie untersucht. Dabei wurde die Beteiligung

von ATG24 im Bereich der Pexophagie, ER-Phagie, Nucleophagie, Proteophagie und Mitophagie beschrieben (Ano et al. 2005; He et al. 2013; Nemeč et al. 2017; Zhao et al. 2016). Insbesondere die Funktion dieses sortierenden Nexins im Bereich der Mitophagie erlangte zunächst große Aufmerksamkeit durch die Untersuchung von He et al. (2013). Durch die Komplementation von MoATG24 durch ScATG24 wurde ATG24 als mögliches Funktionshomolog für das Mitophagierezeptorprotein ScATG32 gesehen. Auch Untersuchungen in *Fusarium graminearum* und *S. pombe* zeigen eine Beteiligung von ATG24 an der Mitophagie (Zhao et al. 2016; Zheng et al. 2018). Allerdings wurde auch festgestellt, dass ATG24 keine Mitophagie-exklusive Rolle besitzt, sondern auch bei weiteren selektiven Formen der Autophagie beteiligt ist (Ano et al. 2005; Nemeč et al. 2017; Zhao et al. 2016). Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ATG24 ein reines Mitophagierezeptorprotein darstellt, eher gering. Hierfür sprechen auch neuere Untersuchungen zu ScATG24 in *S. cerevisiae* welche die Beteiligung von ScATG24 am Retromerkomplexes gezeigt haben (Ma et al. 2017, 2018; Suzuki und Emr 2018a,b).

1.3 Modellorganismen in der Altersforschung

Um die Auswirkungen von Genen und Proteinen auf die Alternsprozesse untersuchen zu können, werden in der Altersforschung Modellorganismen verwendet. Hierbei stehen vor allem Organismen im Fokus, welche eine ungewöhnliche Alterung zeigen, zum Beispiel Organismen, die ungewöhnlich lang- oder kurzlebig sind.

Ein Modellorganismus der Altersforschung sind Nacktmulle (*Heterocephalus glaber*) aufgrund ihrer Langlebigkeit. Nacktmulle erreichen mit einer Lebensspanne von über 30 Jahren ein äußerst hohes Alter für ein Nagetier (Holtze et al. 2021; Ruby et al. 2018). Eine retrospektive Studie von *H. glaber* gab Hinweise, wie alt Nacktmulle werden können. Die bei Ruby et al. (2018) veröffentlichte Kaplan-Meier-Kurve zeigt, dass der letzte aufgezeichnete Todesfall in dieser Studie an Tag 6529 war und die verbleibenden Tiere anschließend über einen Zeitraum von 15 Jahren zensiert wurden. Das letzte Individuum wurde an Tag 11.077 zensiert, sodass dieser Nacktmull mindestens 30,3 Jahre alt wurde. Da eine retrospektive Studie auf historische Datensätze angewiesen ist und aufgrund der Langlebigkeit der Nacktmulle es zu vielen Ungenauigkeiten und somit Zensierungen kommen kann, erfolgte eine Kalkulation

der möglichen Lebensspanne. Dabei zeigt sich, dass 61,6 % der Population die in dem vom Datensatz abgedeckten Zeitraum von 30 Jahren überlebt haben (Ruby et al. 2018). Insbesondere im Hinblick auf mögliche Gene, welche die Langlebigkeit verursachen, sind Nacktmulle daher ein Modellorganismus der Altersforschung, wobei gleichzeitig die Erforschung der Langlebigkeit mit Nacktmullen langwierig ist, weshalb andere Modellorganismen mit einer handhabaren Lebensspanne ebenso im Fokus der Altersforschung stehen.

Eines dieser einfacher zugänglichen Modellorganismen sind Killifische (*Nothobranchius furzeri*). Diese durchlaufen äußerst schnell die Prozesse der Alterung und zeigen eine ungewöhnliche Kurzlebigkeit auf (Blažek et al. 2013; Platzer und Englert 2016). Während andere Fische viele Jahre alt werden können, liegt die durchschnittliche Lebensspanne bei Kilifischen bei 3 bis 7 Monaten (Platzer und Englert 2016). Der Hintergrund dieser kurzen Lebensspanne wird in den Umweltbedingungen der Heimat des Kilifisches gesehen. Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet dieser Fische liegt im südlichen Afrika, wo aufgrund der Trockenzeit die Gewässer meist nach 2 bis 7 Monaten austrocknen, sodass es keinen evolutionären Vorteil für Langlebigkeitsgene gibt (Platzer und Englert 2016). Die kurze Regenzeit in dem Verbreitungsgebiet von *N. furzeri* bedingt, dass dieser Organismus nach der Embryonalentwicklung schnell die Geschlechtsreife erreichen muss, damit eine Fortpflanzung und somit die Arterhaltung möglich ist (Blažek et al. 2013; Platzer und Englert 2016).

Ein weiterer Modellorganismus der Altersforschung stellt *Podospora anserina* dar. *P. anserina* ist ein filamentöser Ascomycet, dessen natürliches Habitat Herbivorendung ist. Bereits seit Mitte des letzten Jahrhunderts wird *P. anserina* als Modellorganismus zur Untersuchung von molekularbiologischen Fragestellungen eingesetzt (Rizet 1953). Vor allem im Bereich der Mitochondrien- und Altersforschung ist *P. anserina* ein etabliertes Untersuchungsobjekt (Osiewacz 2002a, 2011; Scheckhuber et al. 2008). Neben einer kostengünstigen und einfachen Kultivierbarkeit ist das Genom von *P. anserina* vollständig sequenziert und durch molekularbiologische Techniken sind vielfältige Untersuchungen möglich (Osiewacz et al. 2013). *P. anserina* ist vor allem im Bereich der Altersforschung ein etablierter Modellorganismus (Osiewacz 2002b, 2011). Dies begründet sich dadurch, dass dieser Hyphenpilz eine begrenzte Lebensspanne aufweist, was unüblich für Pilze ist (Kück et al. 1985; Osiewacz 2002a). Bei

der Betrachtung von gerontologischen Fragestellungen ist es hilfreich Modellorganismen zu verwenden, welche handhabbare Lebensspannen aufweisen. Dies ist bei *P. anserina* der Fall, da der Wildstamm „s“ etwa 22-25 Tage alt wird (Rizet 1953). Die begrenzte Lebensspanne ist bei diesen Ascomyceten durch das sogenannte Seneszenzsyndrom gut erkennbar. Dabei kommt es zu einem Stopp des Wachstums und im Bereich der Wuchsfront kann eine dunkle Pigmentierung festgestellt werden (Osiewacz et al. 2013). Es handelt sich in diesem Bereich um abgestorbenes Zellmaterial und eine erneute Anzucht dieses Myzels ist nicht möglich. Dies ist darin begründet, dass die Zellteilung von *P. anserina* an den Hyphen stattfindet und bei diesem Pilz die Lebensspanne begrenzt ist. Durch das Wachstum an der Hyphenspitze ist dieser Teil des Pilzes biologisch betrachtet älter, als die Bereiche um die geknospte Spore. Durch diese Besonderheit kann das Alter von *P. anserina* nicht nur in Tagen, sondern ebenso in Zentimetern dargestellt werden (Osiewacz et al. 2013). In früheren Studien zu *P. anserina* konnte festgestellt werden, dass die Lebensspanne genetisch bedingt ist. Dabei sind unter anderem zirkuläre und zytoplasmatisch lokalisierte DNA-Elemente als Seneszenzfaktoren identifiziert worden (Stahl et al. 1978). Diese pDNA genannten DNA-Fragmente akkumulieren in den Mitochondrien von seneszenten Kulturen, während in juvenilen Hyphen nahezu keine pDNA vorliegt (Osiewacz 2002a). Hierbei kommt zu tragen, dass es während der Alterung von *P. anserina* zu einer Umordnung der mitochondrialen DNA (mtDNA) kommt (Kück et al. 1985, 1981; Osiewacz und Esser 1984). Durch die Umlagerungen der mtDNA kommt es zu Duplikationen der Gensequenzen und in der Konsequenz bilden sich die zirkulären pDNA-Moleküle, welche auf dem ersten Intron der Cytochrom c-Oxidase-Untereinheit-I-Gens basieren (Kück et al. 1985, 1981; Osiewacz und Borghouts 2000; Osiewacz und Esser 1984). Die pDNA hat jedoch keinen Replikationsursprung und wird als „mobiles Intron“ bezeichnet (Osiewacz und Esser 1984). Die pDNA ist somit direkt mit der Seneszenz von *P. anserina* assoziiert und eine Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase ist von Vorteil für diesen Pilz.

Die Mitochondrien von *P. anserina* haben eine fundamentale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Alterung dieses Pilzes. Durch die Atmungskette und die dadurch gebildeten ROS haben sich mehrere Systeme ausgebildet, um die Mitochondrien von Schäden zu schützen. Unter anderem Enzyme, wie die Superoxiddismutasen (SOD), welche die Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren, wobei der Verlust dieser Enzyme zu einer

Lebensspannenverkürzung führt (Zintel et al. 2010). Ein weiterer Schutzmechanismus der Mitochondrien stellt die mitochondriale Qualitätskontrolle dar. Es handelt sich dabei um mitochondrialen Proteasen, welche geschädigten Proteinen in den Mitochondrien abbauen. Es wäre anzunehmen, dass der Verlust von diesen Proteasen ebenfalls zu einer verkürzten Lebensspanne führt. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Deletion von Genen, die für Proteine der mitochondrialen Qualitätskontrolle kodieren, zu einer Lebensspannenverlängerung führen (Fischer et al. 2015, 2013; Knuppertz und Osiewacz 2017; Luce und Osiewacz 2009). Begründet werden kann das durch die sogenannten Mitohormesis (Knuppertz und Osiewacz 2017).

Die Mitohormesis beschreibt eine biologische Reaktion auf geringen mitochondrialen Stress, welcher vorteilhaft für Zellen ist. Dabei muss jedoch ein Gleichgewicht gewahrt werden, da ein Übermaß an mitochondrialem Stress sich wiederum destruktiv auswirkt. Durch die Mitohormesis kommt es in einer Vielzahl von Modellorganismen, wie *C. elegans*, Säugern und *P. anserina* zu einer Lebensverlängerung und Steigerung der Gesundheit (Bárcena et al. 2018; Knuppertz et al. 2017; Schulz et al. 2007). Wenngleich der exakte Wirkmechanismus bisher noch nicht vollständig aufgedeckt wurde, scheint die Mitohormesis im Zusammenhang mit einem Anstieg von mitochondrialem ROS zu stehen (Bárcena et al. 2018).

Bei der Betrachtung des Alterns spielen Mitochondrien eine bedeutende Rolle. Untersuchungen zeigen, dass es im Laufe der Alterung von *P. anserina* zu einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion kommt, ebenso wie zu morphologischen Veränderungen (Osiewacz und Borghouts 2000; Osiewacz 2010, 2011; Scheckhuber et al. 2007). Dabei ist die Mitochondriendynamik essenziell für die Verlangsamung oder Beschleunigung des Alternsprozesses, wie bei der Betrachtung der Mitochondrien-abhängigen Alterung in *P. anserina* festgestellt wurde (Rampello et al. 2018; Scheckhuber et al. 2007; Scheckhuber et al. 2008). Bei der Mikroskopie von juvenilen Mitochondrien in *P. anserina* zeigt sich ein hochdynamisches, filamentöses Mitochondriengeflecht, welches durch Fission und Fusion miteinander in Verbindung steht (Scheckhuber et al. 2007; Scheckhuber et al. 2008). Im Laufe der Alterung des Pilzes kommt es immer stärker zu einer mitochondrialen Fragmentierung und einem Rückgang der mitochondrialen Dynamik. Ein Protein, welches hierbei eine bedeutende Rolle spielt, ist das Fissionsprotein PaDMN1 (Scheckhuber et al. 2008). Die Expression von *PaDnm1* ist Alters-assoziiert und eine Deletionsmutante dieses Gens zeigt eine deutlich verlängerte Lebensspanne. Hierbei geht diese Lebensspannenverlängerung jedoch auf Kosten

der Fertilität und Motilität, sodass es zu einem stark verlangsamten Wachstum und einer eingeschränkten Fruchtbarkeit kommt.

Während der Alterung spielt die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Fitness eine zentrale Rolle. Eine weitere Form der mitochondrialen Qualitätskontrolle stellt die Mitophagie dar, die selektive Autophagie zum Abbau von geschädigten Mitochondrien.

1.3.1 Die Autophagie von *Podospira anserina*

Die ersten Untersuchungen zur Autophagie in *P. anserina* wurden von Pinan-Lucarré et al. (2003) zu *PaAtg8* durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass die Deletion von *PaAtg8* (damals noch als *Paldi-7* bezeichnet) zu einem hellen Myzel und einer Verringerung der Lufthyphen im Vergleich zum Wildtyp führt. Der *PaAtg8*-Deletionsstamm war weiblich steril, sodass angenommen werden kann, dass die Autophagie einen Einfluss auf die Bildung der Gametangien in *P. anserina* hat. Durch eine Doppelmutante $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ konnte durch das GFP-markierte PaATG8 durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass bei Nährstoffmangel ein Transport von PaATG8 in die Vakuole stattfindet.

Auch in der Autophagie von *P. anserina* hat PaATG1 eine zentrale Rolle. Bei einem $\Delta PaAtg1/Gfp::PaAtg8$ -Stamm kommt es zu einer Beeinträchtigung der Autophagie, da durch den PaATG1 Verlust kein PaATG8::GFP in die Vakuole transportiert werden kann (Pinan-Lucarré et al. 2005). Allerdings traten in diesem Stamm zytoplasmatisch lokalisierte, undefinierte punktförmige GFP-Signale auf, was darauf hindeutet, dass die Autophagosomenbildung bei Verlust von PaATG1 nicht komplett blockiert ist. Diese Autophagosomen scheinen jedoch nicht funktional zu sein, sodass keine Fusion dieser Strukturen mit der Vakuole stattfindet (Pinan-Lucarré et al. 2005). Auch die *PaAtg1*-Deletionsmutante hat, wie der $\Delta PaAtg8$ -Stamm, eine beeinträchtigte weibliche Fertilität und ein hypopigmentiertes Myzel (Pinan-Lucarré et al. 2005). Der Verlust von PaATG1 führt zu einer verkürzten Lebensspanne von *P. anserina*, sodass der Abbau und Transport von geschädigten Proteinen und Zellorganellen durch die Autophagie ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der normalen Lebensspanne darstellt (Knuppertz 2017; Knuppertz et al. 2014).

Ebenso liegen initiale Untersuchungen zu PaATG24 vor. Dabei wurde in einer Bachelorarbeit,

sowie zwei Masterarbeiten im Arbeitskreis Osiewacz an der Goethe-Universität Frankfurt am Main zunächst ein *PaAtg24*-Deletionsstamm erstellt und anschließend charakterisiert (Brunner 2016; Schürmanns 2015, 2017). Durch initiale Untersuchungen zur Lebensspanne mit einer geringen Stichprobenzahl ist bekannt, dass der Verlust von PaATG24 zu einer Lebensspannenverkürzung führt (Brunner 2016). Auch wurde festgestellt, dass PaATG24 eine Rolle in der Fertilität von *P. anserina* spielt und dieser Stamm männlich steril ist (Brunner 2016; Henkel et al. 2020). Dies ist in einer stark verminderten Spermatienzahl in $\Delta PaAtg24$ begründet, wodurch die sexuelle Fortpflanzung des Pilzes stark eingeschränkt ist. Parallel zu der hier vorliegenden Doktorarbeit, wurde im Zuge einer Masterarbeit die Pexophagie in $\Delta PaAtg24$ untersucht (Schürmanns 2017). Dabei zeigte sich, dass der Verlust von PaATG24 zu einem Pexophagiedefekt führt und es zu einer Akkumulation von Peroxisomen kommt (Henkel et al. 2020; Schürmanns 2017). Peroxisomen sind Organellen, welche den oxidativen Abbau organischer Verbindungen katalysieren. Durch die Verwendung eines Mediums mit Oleat als ausschließlicher Kohlenstoffquelle kann die Funktionalität dieser Organellen untersucht werden. Oleat kann nur durch Peroxisomen abgebaut werden, um für die Zelle verfügbar zu sein. Die Kultivierung von $\Delta PaAtg24$ auf Oleat-haltigem Medium führte zu einer normalen Lebensspanne. Es kann somit davon ausgegangen werden kann, dass die Peroxisomen funktional sind und die Zelle von der Akkumulation dieser Organellen profitiert (Henkel et al. 2020; Schürmanns 2017). Hierbei scheint ein Einfluss von Oleat auf die Vakuolengröße vorzuliegen (Schürmanns et al. 2022)

Im Allgemeinen wird angenommen, dass es sich bei der Autophagie um einen konservierten Mechanismus handelt, wie bereits in Abschnitt 1.2.5 dargestellt. Für diese Hypothese spricht, dass auch in *P. anserina* durch eine *in silico* Analyse putative Homologe zu ATG-Proteinen aus *S. cerevisiae* oder *H. sapiens* identifiziert wurden. Es liegen Homologe zum Beispiel von ATG1, ATG8 und die bisher in *P. anserina* noch wenig untersuchten Proteine ATG11 und ATG24 vor. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass die grundlegenden Mechanismen der Autophagie artübergreifend sind. Dennoch ist es möglich, dass sich im Laufe der Evolution Unterschiede entwickelt haben, wie auch zwischen *H. sapiens* und *S. cerevisiae* deutliche Diskrepanzen (zum Beispiel im ATG1-Komplex und bei ATG8/LC3/GABARAB) festzustellen sind. Es ist

anzunehmen, dass der generelle Ablauf der Autophagie konserviert ist und nicht die einzelnen Bestandteile. Durch die Verwendung von *P. anserina* als Modellorganismus ist es möglich den Einfluss einzelner Proteine und Proteinkomplexe der Autophagie auf die Alterung zu erforschen.

1.4 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Doktorarbeit soll die Funktion und die Rolle von Autophagie-assoziierten Proteinen im Alternsmodell *P. anserina* untersucht werden. Durch die Untersuchungen von PaATG8, PaATG11 und PaATG24 kann die Autophagosomenbildung, die selektive und nicht-selektive Autophagie, sowie assoziierte Prozesse im Zusammenhang zur Alterung des Modellorganismus betrachtet werden.

Bei PaATG8 handelt es sich um ein Protein, welches mutmaßlich auch in *P. anserina* an der Autophagosomenbildung beteiligt ist. Mit Hilfe einer *PaAtg8*-Deletionsmutante soll die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie, als eine Form der selektiven Autophagie, untersucht werden. Hierdurch ist es möglich zu zeigen, ob PaATG8 die gleiche Bedeutung für die Autophagie besitzt, wie es in anderen Organismen gezeigt wurde und ob auch PaATG8-unabhängige Abbausysteme in *P. anserina* vorhanden sind. Durch die Erstellung der *PaAtg8*-Deletionsmutante liegt zusätzlich ein Werkzeug vor, welche für weitere Forschungsansätze zur Betrachtung der alternsassozierten Autophagie genutzt werden kann.

PaATG11 ist in *S. cerevisiae* als Gerüst- und Adapterprotein beschrieben und wird primär für die selektive Autophagie benötigt. Um einen Eindruck zu erhalten, welche Aspekte der selektiven Autophagie in *P. anserina* homolog zu anderen Organismen sind, soll eine Untersuchung von $\Delta PaAtg11$ durchgeführt werden. Neben der Autophagie und Mitophagie in einem *PaAtg11*-Deletionsstamm, soll ebenso der Einfluss auf die Mitochondrien untersucht werden. Falls PaATG11 auch in *P. anserina* ein Protein der selektiven Autophagie ist, könnte der Verlust der Mitophagie zu einer Akkumulation von geschädigten Mitochondrien führen. Dies soll im Detail untersucht werden und zudem geklärt werden, ob ein PaATG11-abhängiger Mitophagiedefekt einen Einfluss auf die Lebensspanne hat.

Als drittes Protein soll PaATG24 untersucht werden. Wie die initialen Untersuchungen zeigten, ist PaATG24 für die Aufrechterhaltung der Lebensspanne, sowie die Fertilität von *P. anserina* nötig. Die Funktion von ATG24 warf zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit viele Fragen auf. Es wurde unter anderem vermutet, dass ATG24 ein putatives Mitophagierezeptorprotein darstellt, wie es bei He et al. (2013) gezeigt wurde. In *S. cerevisiae* schien ScATG24 hauptsächlich für verschiedene selektive Formen der Autophagie benötigt zu werden, während kein Einfluss auf die nicht-selektive Autophagie identifiziert werden konnte (Ano et al. 2005; He et al. 2013; Nice et al. 2002; Zhao et al. 2016; Zheng et al. 2018). Das menschliche Homolog SNX4 wurde als sortierendes Nexin bei der Verteilung von Lipiden und Proteinen in der Zelle beschrieben, wobei es dort vor allem an der Membranabschnürung beteiligt sein sollte (Haft et al. 1998; Leprince et al. 2003; Traer et al. 2007; van Weering et al. 2012a). Um sich der Funktion von PaATG24 in *P. anserina* nähern zu können, sollen zunächst Untersuchungen zur nicht-selektiven Autophagie und Mitophagie in $\Delta PaAtg24$ durchgeführt werden. Ebenso wie bei PaATG11, soll im Fall eines Mitophagiedefekts die Mitochondrien und deren Funktion untersucht werden um einen Rückschluss auf einen möglichen Zusammenhang von Mitophagie, Mitochondrienfunktion und Lebensspanne zu erhalten. Da die Autophagie ein Prozess der Autophagosomenbildung, des Transportes von Autophagosomen und der Fusion mit der Vakuole ist, sollen diese Aspekte in $\Delta PaAtg24$ untersucht werden. Durch eine umfassende Betrachtung des autophagischen Flusses wird es möglich sein die Funktion von PaATG24 in *P. anserina* genauer zu beschreiben und aufzuklären.

Durch die Untersuchungen zu PaATG8, PaATG11 und PaATG24 werden verschiedene Aspekte der Autophagie betrachtet, um einen Aufschluss über das Zusammenspiel der Prozesse des autophagischen Flusses zu erhalten und den Einfluss auf die Alterung mit Hilfe von *P. anserina* als Modellorganismus.

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien und Stoffe wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Stoffe.

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
Agar	Invitrogen	30391-049
Agarose	Invitrogen	15510-027
Agarose	Roth	2267.3
Ammoniumacetat	Merck	1116.1000
Ampicillin	Roth	K029.2
APS	Sigma	A3678
Biotin	Serva	15060
Blockierungsreagenz	Roche	14545800
Bromphenolblau	Merck	1,117,460,005
BSA	Sigma	A6003
CaCl ₂ ×2H ₂ O	Merck	2382.1000
Casaminosäuren	DIFCO	0231-01-0
Chloroform	Merck	1.02445.2500
Citronensäure	Sigma	C-0759
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva	17524
CSPD	Roche	11655884001
CuSO ₄ ×5H ₂ O	Merck	2790.1000
D(+)-Glucose	Sigma	G-5400
Dextrin, gelb	Roth	6777.1
DMPC	Sigma-Aldrich	D-5520
dNTPs	Thermo Fisher Scientific	R0181
DTT	Roth	6908.4
EDTA	Merck	1.08418.1000
Essigsäure	Roth	3738.5
Ethanol p.A.	Roth	9065.2
Ethidiumbromidlösung (0,5 %)	Roth	HP46.1
FM4-64	Thermo Fisher Scientific	T 13320
FeCl ₂ × H ₂ O	Merck	1.03861.0250
FeSO ₄ × 7H ₂ O	Merck	1.03965.0500
Glucose-Monohydrat	Roth	6780.2
Glycerin	Roth	4043.3
Glycin	Roth	3908.2
H ₃ BO ₃	Merck	100165.5000
H ₃ PO ₄	Roth	6366.1

Harnstoff	Merck	1.08487.0500
HCl	Merck	1.00319.2500
Hefeextrakt (Yeast Extrakt)	DIFCO	0127-07
HEPES	Serva	25245
Herings sperma-DNA	Serva	18580
Hexanucleotide Mix	Sigma (Roche)	11277081001
Hygromycin B	Calbiochem	400051
Isoamylalkohol	Merck	979.25
Isopropanol	Roth	6752.4
K ₂ HPO ₄	Roth	P749.1
Kaliumacetat	Roth	4986.1
KCl	Merck	1.04936.1000
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873.1000
KOH	Merck	5033.1000
Klenow Fragment	Thermo Fisher Scientific	EP0054
Maismehl	Cornexo	
Maleinsäure	Merck	800380
Malzextrakt	Roth	X976.1
Manganchlorid	Merck	5934.0100
Mercaptoethanol	Sigma	M-6250
Methanol	Roth	4627.5
MgSO ₄	SERVA	28405
MgSO ₄ × H ₂ O	SERVA	28405
MgSO ₄ × 7H ₂ O	Merck	1.05886.0500
Methanol	Roth	4627.5
MnCl ₂	Merck	5934.0100
MnSO ₄ × H ₂ O	Merck	5934.0100
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich	L5125
Na ₂ HPO ₄	Merck	1.06345.1000
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	Roth	4984.1
NaAc	Merck	1.06268.1000
NBT	Sigma	N-6876
NaCl	Roth	3957.2
NaMoO ₄ × 2H ₂ O	Merck	1065241000
NaOH	Roth	6771.1
Natriumcitrat × H ₂ O	Roth	3580.2
NH ₄ Cl	Merck	1.01145.5000
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ × 6H ₂ O	Sigma	F-3754
Odyssey [®] Blocking Puffer (PBS)	Li-Cor	927-40000
Oligo(dT) ₁₈ Primer	Thermo Fisher Scientific	SO132
PEG 4000	SERVA	33136
Phenol	Roth	0038.2
Phleomycin	Genaxxon	M3429
Roti [®] -Nanoquant	Roth	K880.1
Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	Roth	A515

Saccharose	Roth	4621.2
SDS	Merck	1.13760.0100
Sorbitol	Serva	35230
TEMED	Roth	2367.1
Thiamin	Serva	36020
Tris	Roth	4855.3
Triton X-100	SERVA	37240
Trypton	Otto Nordwald	211701
Tween 20	Sigma	P-2287
Xylencyanol	SERVA	38505
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	8883.0100
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M-6250

2.1.2 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer.

Ampicillin-Lösung

50 mg/ml in H₂O
sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)

Blockierungspuffer (für Southern-Blot)

0,5 % (w/v) Blockierungsreagenz
in 6 x SSC

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

96 % (v/v) Chloroform
4 % (v/v) Isoamylalkohol

Biotin-Stammlösung

50 g/ml in H₂O
sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)

Blotting-Puffer (für Western-Blot)

25 mM TRIS
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
ad 1 l H₂O

Denaturierungslösung für Southern Blot

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
autoklavieren

DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“)

7 % (w/v) SDS
5x SSC
0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin
2 % (w/v) Blockierungsreagenz
50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0)

DIG-Puffer 2

0,5 % (w/v) Blockierungsreagenz
in DIG-Puffer 1 bei 60°C lösen

DIG-Waschpuffer

0,3 % (v/v) Tween 20
in DIG-Puffer 1

DTT-Lösung (1 M)

1 M DTT
in 0,01 M NaAc (pH 5,2)
sterilfiltrieren

Görg-Coomassie-Färbelösung

20 mM CuSO₄·5H₂O
45 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,15 % (w/v) Coomassie Blue G250
in H₂O

Laufpuffer (10x) für SDS-PAGE

0,25 M TRIS
1,9 M Glycin
pH 8,3 (HCl)
autoklavieren
0,1 % (w/v) SDS hinzufügen

DIG-Puffer 1

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5 (NaOH)
autoklavieren

DIG-Puffer 3

0,1 M TRIS
0,1 M NaCl
pH 9,5 (HCl)
autoklavieren

DNA-Ladepuffer (6x)

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol
50 % (w/v) Saccharose
0,1 M EDTA (pH 8,0)

Görg-Coomassie-Entfärbelösung

20 mM CuSO₄·5H₂O
25 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
in H₂O

Heringssperma-DNA

20 mg/ml Heringssperma DNA
in H₂O
1 h bei 60 °C lösen
mehrere Stunden bei RT lagern
regelmäßig mischen
15 min Ultraschallbad

NBT/X-Phosphatlösung

0,48 mM NBT
0,56 mM BCIP
in DIG-Puffer 3

**Neutralisierungslösung
für Southern Blot**

2 M NaCl
1 M TRIS
pH 5,5 (HCl)

PEG-Lösung

60 % (w/v) PEG 4000
50 mM CaCl₂x2H₂O
10 mM TRIS
pH 7,5 (HCl)
autoklavieren

Polyacrylamid-Sammelgel (5 %-ig)

1,24 ml H₂O
500 µl Sammelgelpuffer (4x)
250 µl 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
1,2 µl TEMED
12 µl 10 %-iges APS

Proteinextraktionspuffer

50 mM HEPES
100 mM NaCl
pH 7,4 (HCl)
autoklavieren
1 mM DTT frisch hinzufügen

Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)
0,4 % (w/v) SDS

PBS nach Tropix (10x)

0,68 M NaCl
0,58 M Na₂HPO₄x2H₂O
0,17 M NaH₂PO₄x2H₂O

Phleomycin-Lösung

10 mg/ml in H₂O
sterilfiltrieren

Polyacrylamid-Trenngel (12 %-ig)

2,67 ml H₂O
1,5 ml Trenngel-Puffer (4x)
1,8 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
3 µl TEMED
30 µl 10 %-iges APS

RNase A-Lösung

11 mg RNase A
in 1 ml 0,01 M NaAc (pH 5,2)
15 min aufkochen
nach Abkühlen auf RT:
100 µl 1 M TRIS-HCl (pH 7,4)

SDS-Ladepuffer (3x)

7,5 g Glycerin
7,5 ml (w/v) SDS-Lösung (20 %)
9,375 ml Sammelgelpuffer (4x)
1,5 ml β-Mercaptoethanol
ad 25 ml H₂O

Spurenelementlösung

25 mM Citronensäure
 17,4 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 2,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 1 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 0,3 mM $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 0,8 mM H_3BO_3
 0,2 mM $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 autoklavieren

**Stammlösung 1
 (50x, für Transformationsmedium)**

7,5 % (w/v) KH_2PO_4
 2,5 % (w/v) KCl
 2,7 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 autoklavieren

**Stammlösung A
 (100x, für CM-Medium)**

0,1 % (w/v) $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 0,1 % (w/v) FeCl_2
 0,1 % (w/v) MnCl_2
 in H_2O
 autoklavieren

STET

8 % (w/v) Saccharose
 10 mM TRIS
 50 mM EDTA (pH 8,0)
 5 % (v/v) Triton X-100
 pH 8,0 (HCl)
 autoklavieren

TENS-Puffer

10 mM TRIS
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 100 mM NaCl
 pH 8,0 (HCl)
 autoklavieren
 2 % (w/v) SDS frisch hinzufügen

SSC (20x)

3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat
 pH 7,0 (HCl)

**Stammlösung 2
 (50x, für Transformationsmedium)**

0,005 % (w/v) $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 0,005 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 0,005 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 0,005 % (w/v) $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 autoklavieren

STC

1 M Sorbitol
 10 mM TRIS
 50 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 pH 7,5 (1 N HCl)

TAE-Puffer (50x)

2 M TRIS
 57,1 ml Eisessig
 50 mM EDTA (pH 8,0)
 ad 1l H_2O
 autoklavieren

TE-Puffer

10 mM TRIS
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 pH 8,0 (HCl)
 autoklavieren

Thiamin-Stammlösung

250 mg/l Thiamin in H₂O
sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)

TPS

20 % (w/v) Saccharose
45 mM KH₂PO₄
5 mM Na₂HPO₄·2H₂O
pH 5,5 (H₃PO₄)
autoklavieren

Trenngel-Puffer (4x)

1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)
0,4 % (w/v) SDS

2.1.3 Anzuchtmedien

Die Anzucht und Kultivierung der verwendeten *P. anserina* und *E. coli*-Stämme erfolgte folgenden Nährmedien:

Tabelle 3: Die verwendeten Anzuchtsmedien zur Kultivierung von *P. anserina* und *E. coli*.

AmAc-Medium

(Ammoniumacetat-BMM-Medium)

60 mM Ammoniumacetat
in BMM-Medium
2 % (w/v) Agar
autoklavieren

BMM-Medium

(Biomalz-Mais-Medium)

50 g/l Maismehl
ü. N. bei 60 °C quellen
abfiltrieren
0,8 % (w/v) Malzextrakt
pH 6,5 (KOH)
% (w/v) Agar
autoklavieren
BMM-Hyg: Zugabe 0,1 mg/ml Hygromycin
BMM-Phleo: Zugabe 6 µg/ml Phleomycin

CM-Medium

(Complete Medium)

1 g KH₂PO₄
0,5 g KCl
0,5 g MgSO₄ · 7H₂O
10 g Glucose-Monohydrat
3,7 g NH₄Cl
2 g Trypton
2 g Hefeextrakt
1 ml Stammlösung A
ad 1 l H₂O
pH 6,5 (KOH)
autoklavieren

CM-N_↓-Medium (Complete Medium

ohne Ammoniumchlorid)

1 g KH₂PO₄
0,5 g KCl
0,5 g MgSO₄ · 7H₂O
10 g Glucose-Monohydrat
2 g Trypton
2 g Hefeextrakt
1 ml Stammlösung A
ad 1 l H₂O
pH 6,5 (KOH)
autoklavieren

LB-Medium (Lysogeny Broth)

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % NaCl
pH 7,2 (NaOH)
Festmedium: 2 % (w/v) Agar
autoklavieren
LBA: 50 - 100 µg/ml Ampicillin

M2-Medium (Minimalmedium)

0,25 g KH_2PO_4
0,3 g K_2HPO_4
0,25 g MgSO_4
0,5 g Harnstoff
10 g gelbes Dextrin
ad 1 l H_2O
Festmedium: 2 % (w/v) Agar
autoklavieren
50 µl Biotin-Lösung (0,5 mg/ml)
200 µl Thiamin-Lösung (250 mg/ml)
100 µl Spurenelementlösung

**M2-N_↓-Medium
(Minimalmedium ohne Urea)**

0,25 g KH_2PO_4
0,3 g K_2HPO_4
0,25 g MgSO_4
15 g gelbes Dextrin
ad 1 l H_2O
autoklavieren
50 µl Biotin-Lösung (0,5 mg/ml)
200 µl Thiamin-Lösung (250 mg/ml)
100 µl Spurenelementlösung

**M2-Glycerinmedium
(Minimalmedium mit Glycerin)**

0,25 g KH_2PO_4
0,3 g K_2HPO_4
0,25 g MgSO_4
10 g Glycerin (86 %)
ad 1 l H_2O
autoklavieren
50 µl Biotin-Lösung (0,5 mg/ml)
200 µl Thiamin-Lösung (250 mg/ml)
100 µl Spurenelementlösung

Transformationsmedium

3,7 g Ammoniumchlorid
2 g Trypton
1 g Casaminosäuren
1 g Hefeextrakt
10 g Glucose
342,3 g Saccharose
20 ml Stammlösung 1
20 ml Stammlösung 2
ad 1 l H_2O
pH 7,5 (KOH)
Grundmedium: 1,2 % (w/v) Agar
Überschichtungsmedium: 0,5 % (w/v) Agar
autoklavieren
Selektion: 75 µg/ml Hygromycin oder 6 µg/ml Phleomycin

2.1.4 Stämme

Zur Gewinnung von Plasmiden aus *E. coli* wurde der Stamm XL1-Blue der Firma Stratagene verwendet. Die von *P. anserina* verwendeten Stämme und Isolate sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten *P. anserina* Stämme und Isolate.

Stamm	Isolate	Referenz
Wildstamm „s“	F18260 ⁺ , F18261 ⁻	Rizet (1953)
<i>PaSod1::Gfp</i>	F179191 ⁺ , F194531 ⁻	Zintel et al. (2010)
<i>PaSod3^{H26L}</i>	F179600 ⁺ , F192620 ⁻	Knuppertz et al. (2017)
<i>Gfp::PaAtg8</i>	F155240 ⁺ , F155241 ⁻	Knuppertz (2012)
$\Delta PaKu70$	F112882 ⁻	El-Khoury et al. (2008)
$\Delta PaAtg24^*$	F232030 ⁺ , F232050 ⁻	Brunner (2016)
$\Delta PaAtg24/PaSod3^{H26L}::Gfp^*$	F233170 ⁺ , F233151 ⁻	Brunner (2016)
$\Delta PaAtg24/PaAtg24::Gfp^*$	F232150 ⁺ , F232151 ⁻	Brunner (2016)
$\Delta PaAtg24/Ex3$	F233421 ⁺ , F233431 ⁻	Brunner (2016)
$\Delta PaAtg8^*$	F302680 ⁺ , F302681 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$	F308851 ⁺ , F308850 ⁺	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg8/PaSod1::Gfp^*$	F308901 ⁺ , F308900 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg8/PaSod3^{H26L}::Gfp^*$	F302860 ⁻ , F318311 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg11$	F302790 ⁺ , F302791 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg11/PaSod1::Gfp$	F318391 ⁺ , F318390 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg11/PaSod3^{H26L}::Gfp$	F318441 ⁺ , F318440 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24^*$	F308741 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg24/PaSod1::Gfp^*$	F267530 ⁺ , F267540 ⁻	Diese Arbeit
$\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8^*$	F267301 ⁺ , F267302 ⁻	Diese Arbeit

* Bei Deletionsstämmen von *PaAtg8* und *PaAtg24* erfolgten aufgrund der eingeschränkten Fertilität jeweils Kreuzungen mit dem Wildstamm „s“ und bei Doppelmutanten dem jeweiligen Reporterstamm.

2.1.5 Vektoren

Tabelle 5: Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Vektor	Verwendung	Referenz
pAtg11KO4	Enthält Ampicillin- und Hygromycinresistenzkassette und 5'- und 3'-Flanke von <i>PaAtg11</i> zur Deletion von <i>PaAtg11</i> in $\Delta PaKu70$	Meeßen (2018)

pAN7-1	Enthält Hygromycin-Resistenzgen, Positivkontrolle für <i>P. anserina</i> -Transformation	Punt et al. (1987)
phph-1	Negativkontrolle für <i>P. anserina</i> -Transformation	Roche
pKO4	Enthält Phleomycin-Resistenzgen, für Hybridisiersonde verwendet	Grief (2007)
pSM4	Enthält Hygromycin-Resistenzgen, für Hybridisiersonde verwendet	Scheckhuber et al. (2009)

2.1.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Basensequenz 5'-3'	Verwendung
Atg8-4	CCTTTGAGAAGCGCAAGGC	Quantitative RT-PCR
Atg8-5	GTTGGAGGCAGGACCTCATC	Quantitative RT-PCR
Porin_RT_for	TCTCCTCCGGCAGCCTTG	Quantitative RT-PCR
Porin_RT_rev	GAGGGTGTCCGCAAGTTC	Quantitative RT-PCR

2.1.7 Enzyme

Es wurden die folgenden Enzyme für die Experimente verwendet:

Tabelle 7: Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
HindIII	Thermo Fisher Scientific	ER0501
Lysing Enzyme	Sigma	L1412
Lysozym	Merck	1,052,810,010
Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	EP0441
Ribolock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	EO0381
RNase A	Serva	34390
Taq-Polymerase	Bio&Sell	8.060.010.100

2.1.8 Kits

Tabelle 8: Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen Kits.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
DIG-DNA labeling and detection Kit	Roche	11175033910
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad	170-8882
Plasmid Purification	Qiagen	12145
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel	740 609.250
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel	740 588.250
NucleoSpin® RNA Plant	Macherey-Nagel	740 955.250
NucleoSpin® RNA-Clean-Up	Macherey-Nagel	740 948.250

2.1.9 Hybridisierungssonden

Die Detektion spezifischer DNA-Bereiche durch eine Southern Blot-Analyse erfolgte durch die in Tabelle 9 aufgeführten Hybridisierungs-sonden.

Tabelle 9: Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungs-sonden.

Bezeichnung	Fragmentgröße (Bp)	Herstellung
<i>Ble</i>	1293	Restriktion des pKO4-Plasmids mit BamHI
<i>Hyg</i>	736	Restriktion des pSM4-Plasmids mit XhoI

2.1.10 Antikörper & Sekundärantikörper

Tabelle 10: Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Beschreibung	Hersteller
Anti-GFP	1 : 10000	Monoklonaler Primärantikörper gegen GFP aus Maus, 24 kDa	Sigma (NEP)
Anti-DIG	1 : 10000	Polyklonaler Sekundärantikörper gegen Digoxigenin mit alkalischer Phosphatase	Roche
Anti-PaATG24	1 : 10000	Spezifischer Antikörper gegen PaATG24 aus Kaninchen, 55 kDa	Davids Biotechnologie
Anti-PaMIC10	1 : 10000	Spezifischer Antikörper gegen PaMIC10 aus Kaninchen, 10 kDa	Davids Biotechnologie

Anti-PaPorin	1 : 5000	Spezifischer Antikörper gegen PaPorin aus Kaninchen, 32 kDa	Sigma (NEP)
IR Dye 680 Anti-Rabbit IgG	1 : 15000	Sekundäntikörper aus Ziege	LiCor
IR Dye 800 Anti-Rabbit IgG	1 : 15000	Sekundäntikörper aus Ziege	LiCor
IR Dye 800 Anti-Mouse	1 : 15000	Sekundäntikörper aus Ziege	LiCor
IR Dye 680 Anti-Mouse	1 : 15000	Sekundäntikörper aus Ziege	LiCor

2.1.11 Größenstandards

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Größenstandards verwendet.

Tabelle 11: Verwendete Größenstandards zur Bestimmung der Gen- und Proteingrößen.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM0322
Lambda DNA/HindIII Marker	Thermo Fisher Scientific	SM0102
DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled	Roche	11218590910
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26617

2.1.12 Geräte

Die verwendeten Geräte wurden in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	HS 6606 EC-1	Gettinge
Binokular	GZ6	Leica
Brutschränke	KBW400 und KBW720	Binder
Bunsenbrenner	GASI	Schütt
Eismaschine	AF103 Scotsman	
Elektrophorese-Kammern	Mini-Sub® Cell Wide Mini-Sub® Cell Mini-Protean® II Mini-Protean® Tetra Cell	BioRad

	Mini-Trans-Blot® Cell Protean® II		
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Cell Observer SD - Spinning Disk Confocal Mikroskop	Carl Microscopy	Zeiss
Folienschweißgerät	300 FJR-2	Audion Elektro	
Geldokumentationssystem	IP-CF01.SD mit Digitalkamera & UV-Transilluminator Thermodrucker P93	Peqlab Mitsubishi	
Heizblock	Thermomixer compact Dri-Block DB 3	Eppendorf Techne	
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab	
Hybridisierungssofen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham	
Infrarotscanner	Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR	
Kühlschrank	profi line (4 – 8 °C) Economic-froster (-20 °C) Ultra Low (-80 °C)	Liebherr Bosch SANYO	
Laborabzug	VARIOLAB Mobilien W90	Waldner	
Magnetrührer	yellow MAG HS 7 MR Hei-Mix S MR 3000 Ikameg Reo	yellowline Heidolph Ikameg	
Mikroskop	Laborlux S	Leitz	
Mikrowelle	-	Panasonic	
NanoDrop® Spektrometer	ND-1000	Peqlab	
Netzgeräte	Power Pack 3000 EV202 GPS 200/400 EPS200	BioRad Peqlab GE Healthcare Pharmacia Biotech	
PCR-Geräte	TGradient 96 T1 Thermocycler 96	Biometra	
pH-Meter	Calimatic 761	Knick	
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Pharmacia	
Pipetten	Pipetman (5 ml, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Gilson	
Real-Time PCR Gerät	MyiQ2	BioRad	

Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	ECOMAX	PROTEC
Rotator	VWR Rotator EU-Stecker	VWR
Schüttelinkubatoren	HT-Infors innova TM 4230	Infors New Brunswick Scientific
Schüttler	Rocking Platform Promax 1020	Biometra Heidolph
Sterilbank	NSF 49 LF 460 EC	Clean Air
Trockenschrank	TKE 117	EHRET
UV-Crosslinker	Stratalinker [®] UV Crosslinker 1800	Stratagene
Vakuum-Transferapparatur	VacuGene XL Vacuum Blotting System	GE Healthcare
Vakuumzentrifuge	SpeedVac Plus SC 110A	Savant
Waagen	PB 303 LC 82 M-power	Mettler Toledo Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli-Q Plus	Millipore
Wasserbad	1083 U3	GFL Julabo
Vortex	Vortex-Genie 2 VM-300	Scientific Ind. Neolab
Zentrifugen	5415 C mit F-45-18-11 5417 R mit FA-45-24-11 5424R mit FA-45-24-11 Sorvall RC5B mit Super-Lite gSA SLA-1500 bzw. Sorvall SS34	Eppendorf DuPont

2.1.13 Computerprogramme

Tabelle 13: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Programme.

Programm	Verwendung	Hersteller
Adobe Illustrator CS3	Bildbearbeitung	Adobe Systems
Adobe Photoshop CS3	Bildbearbeitung	Adobe Systems
CloneManager Professional8	<i>in silico</i> Analysen	Sci-Ed Software

ImageJ	Datenauswertung	NIH
IQ5	<i>Real time</i> -PCR Auswertung	BioRad
LaTeX	Textverarbeitung	BCGSoft Ltd.
Microsoft Office 2016	Datenauswertung	Microsoft
Odyssey® Software	Dokumentation, Datenauswertung	Li-Cor
QuantityOne® 1-D Analysis Software	Dokumentation, Datenauswertung	Bio-Rad
ZEN 2.3 SP1-black	Datenauswertung	Carl Zeiss Microscopy
Zotero	Literaturverwaltung	Center for History and New Media

2.1.14 Sonstige Materialien

Die Verwendeten Materialien in dieser Arbeit sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Überblick der genutzten Materialien.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Cellophan	BioRad	165-0963
Glaswolle	Sigma	18421
Hybond N	GE Healthcare	RPN303N
Precellys (Glas, 0,5mm Ø)	Peqlab (VWR)	432-3755
PVDF-Membranen	Millipore	IPFL00010
Whatman Gel Blotting Papier	Whatmann S&S	10426693

2.2 Methoden

2.2.1 Spezifische Methoden für *E. coli*

2.2.1.1 Anzucht von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C in LB-Flüssigmedium unter Schütteln oder auf LB-Agarplatten mit 2 % Agar kultiviert. Dabei wurde dem Medium gegebenenfalls Antibiotika als Selektionsmarker in definierter Konzentration hinzugefügt. Die Aufbewahrung und Lagerung der Stämme erfolgte in 15 % (v/v) Glycerin bei -80 °C.

2.2.1.2 Isolation von Vektoren aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte die Anzucht der Stämme, ausgehend von einer Einzelkolonie, in 5 ml LB-Medium bei 37 °C, 180 rpm für etwa 8 h. Anschließend wurden 150 ml LBA-Medium mit dieser Vorkultur angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Isolation der Plasmide durch die Verwendung des „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der isolierten Plasmid-DNA erfolgte in 50-100 µl Millipore-H₂O. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA durch ein NanoDrop[®]-Spektrometer (Pecolab) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.2 Spezifische Methoden für *P. anserina*

2.2.2.1 Anzucht von *P. anserina*

Die Kultivierung der *P. anserina*-Stämme erfolgte bei 27 °C und Dauerlicht. Als Medium wurde je nach Versuchsaufbau BMM-Agarplatten, M2-Agarplatten, M2-Rennrohre, M2-Gly-Agarplatten oder Muldenobjektträger mit M2-Medium oder M2-N₂-Medium mit jeweils 2 % (w/v) Agar verwendet. Die Kultivierung in CM-Flüssigmedium und CM-N₂-Flüssigmedium wurde bei 27 °C und Dauerlicht unter Schütteln durchgeführt.

2.2.2.2 Isolation von *P. anserina* Sporen

Für die Isolation von *P. anserina* Sporen wurde eine Kreuzung zweier monokaryotischer Individuen mit unterschiedlichem Kreuzungstyp auf M2-Agarplatten angesetzt. Hierzu wurden

die Myzelstücke der Ausgangsstämme in einem Abstand von etwa 5 cm angeimpft und für etwa 14 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Bei der Verwendung von Stämmen mit eingeschränkter Fertilität erfolgte die Kreuzung mit dem Wildstamm, beziehungsweise bei Doppelmutanten mit dem entsprechenden Reporter-/Kontrollstamm. Nach der Inkubationszeit kommt es im Bereich der Kontaktzone zur Bildung der Perithezien, in welchen sich die Asci mit den Sporen befinden. Dabei enthält ein Ascus zumeist vier dikaryotische Sporen. Jedoch kann es aufgrund einer Beeinträchtigung der Kernteilung durch eine Irritation des Spindelapparates zu der Bildung von zwei monokaryotischen Sporen kommen, sodass insgesamt pro Ascus bis zu acht monokaryotische Sporen vorkommen können. Da diese Sporen nur einen Kern enthalten, sind sie kleiner als die üblichen dikaryotischen Sporen und können so leicht identifiziert werden. In den folgenden Experimenten dieser Arbeit wurde mit monokaryotischen Sporen gearbeitet. Bei der Sporenisolation wurden die Sporen eines Ascus mit Hilfe einer Präpariernadel auf AmAc-Agarplatten überführt und zum Keimen für zwei Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert.

2.2.2.3 Bestimmung von Wuchsraten und Lebensspannen

Die Bestimmung der Lebensspannen und Wuchsraten erfolgte während der Inkubierung in Rennrohren mit je 50 ml M2-Medium (2 % (w/v) Agar) oder auf Agarplatten mit jeweils 30 ml M2-Medium oder M2-Gly-Medium (je 2 % (w/v) Agar). Hierzu wurde jeweils ein Myzelstück der isolierten und ausgekeimten monokaryotischen Sporen auf das jeweilige Medium gesetzt und bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Zur Protokollierung des Wachstums erfolgte eine Markierung der Wuchsfrent alle zwei Tage bis zum Auftreten einer unregelmäßigen oder verfärbten Wuchsfrent. Die ausgewertete Lebensspanne entspricht den Tagen des Wachstums einschließlich der zwei Tagen Keimung, bis zum absterben des Pilzes. Bei der Betrachtung der medianen Lebensspanne wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem 50 % der Isolate kein Wachstum mehr zeigten. Die dargestellte Wuchsrate in cm pro Tag entspricht dem durchschnittlichen Wachstum aller Isolate während eines Zeitraums des konstanten Wachstums.

2.2.2.4 Herstellung von Doppelmutanten

In dieser Arbeit wurden Doppelmutanten erstellt um zum Einen durch das Einbringen von Reporterstämmen die Eigenschaften von Deletionsmutanten untersuchen zu können und

zum Anderen die Auswirkung des Verlustes zweier Gene zu bestimmen. Hierzu wurden zwei monokaryotische Individuen unterschiedlichen Paarungstyps der zwei Ausgangsstämme auf M2-Agarplatten angeimpft und wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben eine Kreuzung durchgeführt. Bei der anschließenden Sporenisolation wurden jedoch nicht die irregulären Asci mit monokaryotischen Sporen isoliert, sondern Asci mit vier dikaryotischen Sporen, welche nach der Keimung auf das Vorhandensein der Selektionsmarker der Ausgangsstämme untersucht wurden. Um die Resistenz der vier Sporen des jeweiligen Ascus zu testen, wurde jeweils ein Myzelstück auf BMM-Agarplatten mit Phleomycin oder Hygromycin angeimpft und für 2 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Mit den Sporen eines Ascus, welcher das gesuchte Resistenzschema zeigte, wurde im Anschluss die DNA dieser Stämme isoliert und eine Southern Blot-Analyse zur Verifizierung des Genotyps durchgeführt.

2.2.2.5 Sphäroplastierung und Transformation von *P. anserina*

Sphäroplastierung von Myzel

P. anserina besitzt als filamentöser Ascomycet eine stabile Zellwand und damit eine Transformation dieses Pilzes möglich ist, muss diese zunächst entfernt werden. Da in dieser Methode zur Protoplastierung von *P. anserina* nur ein unvollständiger Verdau der Zellwand stattfindet, erhält man transformierbare Sphäroplasten. Zur Sphäroplastierung wurden zunächst 8 BMM-Agarplatten mit Cellophan mit Myzelstückchen des Stammes $\Delta PaKu70$ angeimpft und für 2 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Diesem Stamm fehlt ein Protein des DNA-Reparatursystems, wodurch eine effizientere homologe Rekombination stattfindet. Das gewachsene Myzel wurde anschließend in jeweils einen Weithalskolben mit CM-Flüssigmedium überführt und für weitere 2 Tage bei 27 °C, Dauerlicht und unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Myzel über zwei sterile Lagen Mull filtriert und mit TPS-Puffer gewaschen und möglichst viel Flüssigkeit entfernt. Es folgte die Bestimmung des Feuchtgewichts und je Sphäroplastierung wurden maximal 20 g Myzel eingesetzt. Die Sphäroplastierung wurde das sogenannte Lysing Enzyme verwendet. Hierzu wurden 5 ml Lysing-Enzyme-Suspension (in TPS) pro g *P. anserina* Myzel verwendet. Nach Überführung des Myzel-Enzym-Gemischs in einen „Waring Blendor“ (Waring) erfolgte eine Zerkleinerung des Myzels für 2 x 5 s auf kleiner und anschließend 2 x 5 s auf hoher Stufe. Diese Suspension

wurde anschließend in einen sterilen Weithalskolben überführt und im Wasserbad bei 35 °C für 1,5 h inkubiert und gelegentlich geschwenkt. Nach einer mikroskopischen Kontrolle des Sphäroplastierungsfortschritts, wurde das Gemisch zunächst über 4 sterile Lagen Mull und anschließend durch einen Glaswolltrichter filtriert um die Sphäroplasten von den Myzelresten zu trennen. Das Filtrat wurde anschließend in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen für 10 min bei 4.000 rpm, RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet, bestehend aus den Sphäroplasten, wurde in 1 ml TPS vorsichtig gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min, 4.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 1 ml TPS suspendiert. Dieser Schritt wurde weitere drei mal wiederholt, um das verbliebene Lysing Enzyme vollständig zu entfernen. Danach erfolgte eine Zählung der Sphäroplasten mit einer Thoma-Zählkammer, basierend auf einer 1:100 Verdünnung. Die so gewonnenen Sphäroplasten konnten im Anschluss direkt für eine *P. anserina*-Transformation verwendet werden, oder es erfolgte eine Lagerung bei -80 °C.

Transformation von *P. anserina*

Für die Transformation der *P. anserina* Sphäroplasten wurden je Ansatz 1×10^7 Sphäroplasten verwendet. Diese wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, für 10 min bei 4.000 rpm, RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Sphäroplastenpellet in 200 µl STC suspendiert und bei den folgenden Schritten auf Eis gehalten.

Für die Transformation wurden je 10 µg Vektor-DNA in 40 µl H₂O verwendet. Neben des Deletionscosmids wurde je ein Transformationsansatz mit dem Plasmid pAN7-1 (Positivkontrolle, vermittelt Hygromycin-Resistenz) und ein Ansatz mit der Negativkontrolle phph-1 transformiert, welche keine Resistenz vermittelt. Zusätzlich wurde bei jeder Transformation die Regenerationsfähigkeit der Sphäroplasten ermittelt. Hierzu wurde ein Ansatz der Sphäroplasten mit 40 µl H₂O inkubiert.

Die DNA, beziehungsweise das H₂O, wurden zu jeweils einem Aliquot der Sphäroplasten gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 50 µl PEG gegeben und es folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Danach wurden die Ansätze in 10 ml PPN-Röhrchen überführt und in drei Schritten insgesamt 2 ml PEG zu jedem Transformationsansatz hinzugefügt, vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann

erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min und abschließend die Zugabe von 4 ml STC zu jedem Ansatz und vorsichtigem mischen.

Als finaler Schritt wurden die Transformationsansätze mit Hilfe von Überschichtungsmedium ausplattiert. Hierzu wurde Überschichtungsmedium (0,8 % (w/v) Agar) und Agarplatten mit Transformationsmedium (1,2 % (w/v) Agar) verwendet. Für die Untersuchung der Regenerationsfähigkeit der Sphäroplasten wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-6} erstellt und jeweils 1 ml der Lösung mit 4 ml des Überschichtungsmediums vermischt und auf die Agarplatten gegeben, dabei wurde Medium ohne Selektionsmarker verwendet. Für die Transformationsansätze mit dem Deletionscosmid, der Positivkontrolle und der Negativkontrolle wurden jeweils 800 μ l mit je 4 ml Überschichtungsmedium mit Hygromycin vermischt und auf Agarplatten ebenfalls mit dem Selektionsmarker ausplattiert. Alle Ansätze wurden bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Zur Überprüfung der Regenerationsfähigkeit erfolgte eine Auszählung der Sphäroplasten, welche in der Lage waren Myzel auszubilden nach 4 Tagen Inkubation. Sofern die Positiv- und Negativkontrollen eine erfolgreiche Transformation der Sphäroplasten zeigte, erfolgte eine Inkubation der Transformationsansätze zur Erstellung von Deletionsstämmen für 12-14 Tage. Transformanten, welche Myzel bildeten, wurden auf einer BMM-Agarplatte gesichert und die Hygromycin-Resistenz durch BMM-Agarplatten mit Hygromycin überprüft. Abschließend erfolgte eine Southern Blot-Analyse zur Verifizierung der Stämme.

2.2.3 Spezifische Methoden zur DNA-Analyse

2.2.3.1 Isolation genomischer DNA aus *P. anserina*

Zur Untersuchung des Genotyps verschiedener *P. anserina* Stämme und Isolate erfolgte zunächst eine Isolation der genomischen DNA. Hierzu wurden Myzelstückchen der jeweiligen Isolate auf BMM-Agarplatten mit Cellophan verteilt und für 2 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Anschließend wurde das Myzel in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml frisch angesetzten TENS-Puffer hinzugefügt. Es wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion nach durchgeführt und die erhaltene genomische DNA in 50 μ l H₂O gelöst.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. hierzu wurden die aufzutrennenden DNA-Proben mit einem 6 x Ladepuffer versetzt und auf ein 1,5 %-iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde je nach Experiment ein GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder oder Lambda DNA/HindIII Marker als Größenstandard verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für etwa 1,5 h in 1x TAE-Puffer. Nach der Auftrennung wurde das TAE-Agarosegel in ein Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) für 15-20 min inkubiert und anschließend die DNA-Banden mit Hilfe eines Transilluminators per UV-Licht detektiert.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Bestimmung von Oligonukleotiden

Die Konzentration von Oligonukleotiden wurde mit einem NanoDrop[®]-Spektrometer (Peqlab) nach Herstellerangaben bestimmt. Für die Messung der Oligonukleotidkonzentration erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) und zur Berechnung folgende Formel verwendet:

$$c = \frac{E_{260}}{\varepsilon}$$

Hierbei entspricht ε der molaren, dekadischen Extinktion, welche sich durch die Anzahl der Nukleotide A, C, G und T wie folgt berechnen lässt:

$$\varepsilon = A \times 16.000 + C \times 7.000 + G \times 12.000 + T \times 9.600$$

Bestimmung von genomischer DNA

Die Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA aus *P. anserina* erfolgte durch ein densitometrisches Verfahren. Hierzu wurde je 1 µl der isolierten und gelösten DNA mit 9 µl H₂O versetzt, 6x Ladepuffer hinzugefügt und auf einem 1 %-igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Zusätzlich wurden 250 ng des λ-HindIII-Markers aufgetragen, bei welchem die DNA-Menge ausgewählter Banden bekannt ist. Darauf basierend konnte nach Visualisierung der DNA durch Ethidiumbromid und Dokumentation des Agarosegels eine digitale Auswertung und Bestimmung

der DNA-Konzentration mit dem Programm „Quantity One 1-D Analysis Software“ (Biorad) durchgeführt werden.

2.2.3.4 Restriktion von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA oder genomischer DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme besitzen eine spezifische Erkennungssequenz und wurden nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl gewählt, bestehend aus dem jeweiligen Enzym, dem optimalen Puffer und je nach Anwendung 500-1.000 ng DNA. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 37 °C.

2.2.3.5 Southern Blot-Analyse

Eine Methode um DNA zu analysieren stellt die Southern Blot-Analyse nach Edwin M. Southern dar. Dabei wird DNA auf einer Nylonmembran fixiert, mit DNA-Sonden hybridisiert und anschließend visualisiert. Hierdurch ist es möglich spezifische Gensequenzen im Genom zu detektieren. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte dieser Analyse dargestellt.

Southern Blot-Transfer

Zunächst wurden 500-1.000 ng der isolierten genomischen DNA von *P. anserina* mit einem geeigneten Restriktionsenzym, in diesem Fall HindIII, ü. N. inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Zugabe von 0,5 µl RNase A je Ansatz und eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Danach wurden die Proben auf einem 1 %-igen TAE-Agarosegel aufgetragen und zusätzlich ein DIG-markierter λ-HindIII-Marker als Größenstandard verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V für 1,5 h. Der Transfer der DNA erfolgt mit Hilfe einer Vakuum-Transferapparatur (GE Healthcare) auf eine Nylonmembran (Hybond-N; GE Healthcare), welche auf eine passende Größe zugeschnitten und kurz in 2x SSC inkubiert wurde. Die Nylonmembran wurde auf der Vakuum-Transferapparatur platziert und das Agarosegel luftblasenfrei darüber positioniert. Dann erfolgte die Überschichtung des Agarosegels mit einer 0,25 N HCl-Lösung für 20-30 min bei einem Vakuum von 50 mbar, welches auch für die nachfolgenden Schritte aufrechterhalten wurde. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und für 20-30 min zunächst Denaturierungslösung, gefolgt von Neutralisierungslösung

auf das Agarosegel gegeben. Der Schritt des DNA-Transfers auf die Nylonmembran erfolgte durch eine Inkubation des Agarosegels für 1,5 - 2 h mit 20x SSC. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Agarosegel entfernt und die Membran erneut kurz in 2x SSC gegeben und anschließend getrocknet. Zur Fixierung der DNA auf der Nylonmembran erfolgte eine beidseitige UV-Bestrahlung mit Hilfe eines UV-Crosslinkers von Stratagene. Anschließend konnte direkt eine Hybridisierung durchgeführt werden, oder die Nylonmembran für einige Tage bei RT gelagert werden.

Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden

Für die spezifische Detektion von DNA, zum Beispiel zur Überprüfung des Vorhandenseins einer Resistenzgenkassette durch eine Southern Blot-Analyse, musste zunächst eine Digoxigenin-markierte DNA-Hybridisiersonde erstellt werden. Für die Herstellung einer solchen Sonde wurde zunächst ein DNA-Fragment durch Restriktion aus einem geeigneten Plasmid gewonnen, welches die zu untersuchende Sequenz enthält. Dazu wurde das Plasmid mit geeigneten Restriktionsenzymen ü. N. geschnitten und durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das spezifische DNA-Fragment wurde anschließend aus dem TAE-Agarosegel herausgeschnitten und mit Hilfe des „Nucleospin® Gel and PCR Clean-up“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DIG-Markierung der Sonde erfolgte mit jeweils 500-1000 ng des aufgereinigten DNA-Fragmentes durch das „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Markierungseffizienz der neu erstellten Hybridisiersonde. Hierzu wurden Verdünnungen einer DIG-markierten Kontroll DNA, sowie definierte Volumina der neu erstellte DIG-markierte DNA-Sonde auf eine Nylonmembran aufgetragen und beidseitig im UV-Crosslinker fixiert. Zur Visualisierung der DIG-markierten Sonden erfolgte eine Detektion, wie im folgenden Abschnitt (2.2.3.5) beschrieben, jedoch wurde NBT/X-Phosphat als Farbsubstrat statt CSPD verwendet.

DIG-Hybridisierung und DIG-Detektion

Die Hybridisierung der Nylonmembranen mit den erstellten DIG-markierten DNA-Sonden erfolgte in Hybridisierröhren (GE Healthcare) unter konstanter Bewegung durch einen

Hybridisierungssofen (Amersham). Zunächst wurde die Membran abgesättigt durch 1 h bei RT in 6x SSC mit 0,5 % Blocking-Reagenz. Anschließend erfolgte die Prähybridisierung mit High-SDS-Puffer mit 1/100 Volumen denaturierter Heringssperma-DNA für 3 h bei 55 °C. Für die Hybridisierung wurde die Membran mit High-SDS-Lösung mit 1/100 Volumen denaturierter Heringssperma-DNA und 25 ng/ml denaturierter Hybridisiersonde über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte zunächst das Abwaschen der ungebundenen und überschüssigen DIG-markierten Sonde. Hierzu wurde die Nylonmembran für 2 x 5 min bei RT in 2x SSC mit 0,1 % SDS und anschließend 2 x 15 min bei 68 °C in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS inkubiert. Für die Detektion der DIG-markierten DNA-Sonden wurde die Nylonmembran kurz mit Waschpuffer gewaschen, dann für 30 min mit DIG-Puffer 2 und anschließend mit der Antikörperlösung (1:10.000 in DIG-Puffer 2) für 30 min inkubiert. Um ungebundenen und überschüssigen anti-DIG-Antikörper wieder von der Nylonmembran zu entfernen, erfolgten drei Waschschrte mit Waschpuffer für jeweils 10 min. Nach kurzer Inkubation in DIG-Puffer 3 wurde die Nylonmembran aus der Hybridisieröhre genommen, auf eine Folie gelegt und 250-500 µl CSPD-Substratlösung (1:100 in DIG-Puffer 3) auf die Membran gegeben und nach kurzer Einwirkzeit durch Ausstreichen wieder entfernt. Die Nylonmembran wurde im Anschluss in die Folie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte entweder durch Auflegen eines Röntgenfilms mit einer Expositionszeit von mindestens 3 h und anschließender Entwicklung des Films durch eine Entwicklungsmaschine (Protec). Dabei wurde eine Belichtungszeit von 3 - 60 min gewählt. Für eine erneute Hybridisierung einer Nylonmembran musste zunächst die bereits gebundene DNA-Sonde entfernt werden. Nach dem Entfernen der Einschweißfolie und Überführen in eine Hybridisieröhre, wurde die Nylonmembran für 5 min bei RT mit H₂O gewaschen, dann 2 x 10 min bei 37 °C in 0,2 N NaOH mit 0,1 % SDS inkubiert und mit 2 x 15 min bei 37 °C in 2x SSC behandelt. Nach einer Prähybridisierung der Nylonmembran konnte die erneute Hybridisierung durchgeführt werden.

2.2.4 Spezifische Methoden zur RNA-Analyse

2.2.4.1 RNA-Isolation aus *P. anserina*

Für die Isolation von RNA aus *P. anserina* wurde das Myzel der jeweils zu untersuchenden Stämme auf BMM-Agarplatten mit Cellophan für 2 Tage bei 27 °C und Dauerlicht angezogen.

Das gewachsene Myzel wurde in ein „Precellys“-Reaktionsgefäß mit Glasbeads (Peqlab) überführt und 450 µl RA1-Lösung mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte für 2 x 25 s bei 5800 rpm mit einer Pause von 10 s in einem „Precellys“-Homogenisator (Peqlab). Nach Zentrifugation für 5 min bei 10000 rpm und 4 °C erfolgte die Isolation der RNA aus dem Überstand nach dem „NucleoSpin® RNA Plant“-Kit (Macherey-Nagel) und anschließend eine Aufreinigung der RNA nach rDNase-Verdau nach dem „NucleoSpin® RNA Clean up“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die RNA in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Nach Isolation von RNA aus *P. anserina* erfolgte die Synthese von cDNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase wie in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA.

Komponente	Menge
RNA	2 µg
Oligo(dT) ₁₈	2 µl
DMPC-H ₂ O	ad 25 µl
5 min bei 65 °C, dann 4 °C	
5x Reaktionspuffer	1x
RNase-Inhibitor	20 U
dNTPs (10 mM)	1 mM
Reverse Transkriptase	200 U
60 min bei 42 °C, dann 10 min bei 70 °C	

Nach erfolgreicher cDNA-Synthese wurden die Proben im Anschluss bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung von relativen Transkriptmengen erfolgte eine quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR) der synthetisierten cDNA-Proben. Dies wurde mit Hilfe des „iQ™ SYBR® Green Supermix“ von BioRad nach Herstellerangaben durchgeführt. Basierend auf einer üblichen PCR, wird bei dieser Untersuchung in jedem Zyklus der Fluoreszenzfarbstoffs „SYBR® Green“ verwendet, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Der so entstehende

Farbstoff-DNA-Komplex absorbiert Licht bei $\lambda_{max}=498$ nm und emittiert bei $\lambda_{max}=522$ nm. Hierdurch ist es möglich bei jedem Elongationszyklus die gebildete DNA-Menge zu quantifizieren, welche mit dem Ct-Wert korreliert. Der Ct-Wert zeigt den Zyklus an, bei welchem ein lineares Wachstums der Transkriptmengen erfolgt. Bevor eine qRT-PCR durchgeführt werden kann, muss zunächst die optimale Anlagerungstemperatur, die optimale Oligonukleotidkonzentration und die Effizienz der verwendeten Oligonukleotidpaare nach Pfaffl (2001) ermittelt werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Darstellung der optimalen Anlagerungstemperatur, Oligonukleotidkonzentration und die ermittelte Effizienz der verwendeten Oligonukleotidpaare.

Oligonukleotide	Optimale Anlagerungstemperatur (°C)	Optimale Oligonukleotidkonzentration (mM)	Ermittelte Effizienz
Atg8-4	60	450	2,07
Atg8-5			
Porin_RT_for	60	900	2,03
Porin_RT_rev			(Servos et al. 2012)

Um eine Vergleichbarkeit der Transkriptmengen zu gewährleisten, erfolgte eine Normalisierung der cDNA auf *PaPorin*. Wie in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, erfolgt während der Alterung von *P. anserina* nahezu keine Änderung der *PaPorin*-Menge, sodass sich dieses Gen als Referenz eignet (Philipp et al. 2013). Aufgrund experimenteller Schwankungen erfolgte eine Dreifachbestimmung jeder Probe. Anschließend wurde das Expression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zum Referenzgen nach folgender Formel von Servos et al. (2012) berechnet:

$$RelativeExpression = \frac{(E_{Referenzgen})^{Ct_{Referenzgen}}}{(E_{Zielgen})^{Ct_{Zielgen}}}$$

Basierend auf E, der zuvor bestimmten Effizienz des jeweiligen Oligonukleotidpaares, kann so mit Hilfe des Ct-Wertes die relative Expression des Zielgens im Bezug zum Referenzgen bestimmt werden.

2.2.5 Spezifische Methoden zur Protein-Analyse

2.2.5.1 Proteinisolation aus *P. anserina*

Um Gesamtprotein aus *P. anserina* zu isolieren, erfolgte eine Anzucht der jeweiligen Stämme zunächst für 2 Tage auf M2-Agarplatten mit Cellophan bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Anschließend wurde das Myzel in einen Weithalskolben mit 200 ml CM-Flüssigmedium überführt und 3 Tage bei 27 °C und Dauerlicht unter Schütteln inkubiert. Zur Isolation des Gesamtproteins wurde das Myzel über zwei Lagen Mull abfiltriert und möglichst viel Medium durch ein kräftiges Pressen entfernt. Je Probe wurden etwa 250 mg Myzel in ein „Precellys“-Reaktionsgefäß mit Glasbeads überführt und das zweifache Volumen Proteinextraktionspuffer mit 5 mM DTT hinzugefügt und auf Eis gehalten. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe eines „Precellys“-Homogenisators (Peqlap) für 2x 25 s bei 5800 rpm mit einer Pause von 10 s. Anschließend wurde die Probe bei 10000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Gesamtproteinproben bei -20 °C.

2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um in den nachfolgenden Experimenten mit definierten Proteinkonzentrationen arbeiten zu können, wurde zunächst eine Proteinkonzentrationsbestimmung der zuvor isolierten Gesamtproteinproben nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Für die Erstellung einer Eichgeraden wurden je 0, 5, 10 und 20 µg BSA verwendet, dann 10 µl Proteinextraktionspuffer hinzugefügt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 800 µl Roti[®]-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth) in einer Verdünnung von 1:5 hinzugegeben und photometrisch die Extinktion bei 450 nm und 590 nm gemessen und der Quotient bestimmt. Die dadurch bestimmte Eichgerade konnte zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtproteinproben genutzt werden. Dazu wurden je 2 µl Proteinextrakt, 8 µl Proteinextraktionspuffer, 190 µl H₂O und 800 µl Roti[®]-Nanoquant-Reagenz vermischt und ebenfalls die Extinktion bei 450 nm und 590 nm gemessen, der Quotient bestimmt und mit Hilfe der zuvor erstellten Eichgerade die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.5.3 Western Blot-Analyse

Zur Untersuchung von Proteinproben kann eine Western Blot-Analyse durchgeführt werden, bei welcher nach Auftrennung der Proteinproben auf einem Polyacrylamidgel eine Übertragung der Proben auf eine PVDF-Membran erfolgt, wodurch es im Anschluss möglich ist durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern bestimmte Proteine zu detektieren und zu quantifizieren. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte dieser Analyse dargestellt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Gesamtproteinproben erfolgte durch eine denaturierende Gelelektrophorese mit Hilfe des Elektrophorese-Systems „Mini-Protean® Tetra Cell“ (BioRad) nach Herstellerangaben. Dazu wurden 12 %-ige Polyacrylamid-Trenngele mit 5 %-igen Polyacrylamid-Sammelgele verwendet. Von den jeweiligen Proteinproben wurden 50 - 100 µg Proteinextrakt mit Proteinextraktspuffer (mit 5 mM DTT) auf 16 µl aufgefüllt, 8 µl SDS-Ladepuffer und 1 µl Bromphenolblau hinzugefügt und die Ansätze für 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, sowie 1,5 µl „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific) als Größenstandard. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei 100 V für 1,5-2 h in 1x Laufpuffer mit 0,1 % SDS. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel aus der Apparatur herausgenommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinproben weiterverwendet.

Western Blot-Transfer

Die Übertragung der aufgetrennten Proteinproben aus dem SDS-Polyacrylamid-Trenngel auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran erfolgte in einem „Wet/Tank-Blot“-Verfahren mit Hilfe des „Mini Trans-Blot® Cell“ (BioRad) nach Herstellerangaben. Nach Zusammensetzen der Apparatur wurde diese mit kaltem Blotting-Puffer aufgefüllt und es erfolgte der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran bei 100 V und 4 °C für 60 min. Danach wurde die Membran kurz in Methanol und anschließend H₂O gegeben. Es folgte die Blockierung der Membran mit Odyssey®-Blocking-Puffer für 60 min auf einem Schüttelinkubator. Nach Transfer der Proteine, wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 60 min mit Görg-Coomassie Färbelösung gefärbt und

anschließend über Nacht mit Görg-Coomassie Entfärbelösung inkubiert.

Western Blot-Detektion

Die Detektion ausgewählter Proteine nach Western Blot-Transfer erfolgte mit spezifischen Antikörpern nach Herstellerangaben des „Odyssey® Western Blot Analysis“-System (LI-COR). Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper, wurde die PVDF-Membran vier mal mit 1x PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 60 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Es folgten erneut vier Waschschriffe mit 1x PBS mit 0,1 % Tween 20 und anschließend eine Inkubation in 1x PBS ohne Tween für 5 min. Die Aufbewahrung der PVDF-Membran erfolgte in 1x PBS ohne Tween bei 4 °C. Zur Detektion der Sekundärantikörper wurde das „Odyssey® Infrared Imaging System“ (LI-COR) nach Herstellerangaben verwendet. Mit Hilfe der zugehörigen Software war, basierend auf den zuvor mit Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen, eine Quantifizierung der jeweils untersuchten Proteine möglich.

2.2.6 Spezifische Methoden zur mikroskopischen Analyse

Für die mikroskopischen Analysen erfolgte eine Anzucht der jeweiligen *P. anserina*-Stämme auf Muldenobjektträger mit M2- oder M2-N₂-Medium mit 2 % Agar. Dazu wurde jeweils ein Myzelstück auf die vorbereiteten Objektträger gesetzt und über Nacht bei 27 °C und Dauerlicht in einer sterilen feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Myzelstück entfernt und die Mikroskopie durchgeführt. Zur Untersuchung der Vakuolen erfolgte eine Färbung für 5 Stunden mit 2 µg/ml FM4-64 vor Mikroskopie unter Lichtabschluss. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Cell Observer SD - Spinning Disk Confocal Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy). Für die Aufnahmen wurde ein 63x/1,4 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Microscopy) verwendet.

Zur Quantifizierung der Autophagosomenzahl wurden representative z-Stapel der Stämme aufgenommen und mit Hilfe des Programms ZEN 2.3 SP1-black (Carl Zeiss Microscopy) „maximum intensity projection“-Abbildung erstellt, welche mit ImageJ 1.520 (NIH) analysiert wurden. Der Schwellenwert für den Hintergrund wurde durch die Einstellung „MaxEntropy“

gewählt und der Schwellenwert der Autophagosomen erfolgte manuell. Anschließend erfolgte die Zählung der Autophagosomen durch die Einstellung „analyze particles“. Um auszuschließen, dass GFP-Signale in Vakuolen mitgezählt werden, erfolgte nur eine Zählung von Partikeln mit einer Größe von 0,2 bis 1,5 μm .

Ergebnisse

3.1 Beobachtung des Einflusses von PaATG8 auf die Autophagie von *P. anserina*

In Säugern, Pflanzen und Pilzen ist ATG8 als Autophagie-assoziiertes Protein beschrieben, welches an der Bildung der Autophagosomen beteiligt ist (Kirisako et al. 1999; Sugawara et al. 2004; Yoshimoto et al. 2004). Auch vorherige Arbeiten in *P. anserina* konnten zeigen, dass PaATG8, früher auch als PaIDI-7 bezeichnet, in den Autophagosomen lokalisiert ist und bei Nährstoffmangel in die Vakuole transportiert wird (Pinan-Lucarré et al. 2003). In dieser vorliegenden Doktorarbeit wurden die Befunde von Pinan-Lucarré et al. (2003) durch die erneute Erstellung eines *PaAtg8*-Deletionsstammes verifiziert und als Werkzeug zur Untersuchung von Fragestellungen zur Autophagie etabliert. Hierzu sollte untersucht werden inwiefern der Verlust dieses autophagosomalen Proteins einen Einfluss auf die nicht-selektive und selektive Autophagie von *P. anserina* hat. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob der Verlust von PaATG8 einen Einfluss auf Alterungsprozess dieses Modellorganismus hat.

Um den Einfluss von PaATG8 auf die Alterungsprozesse und die Autophagie von *P. anserina* untersuchen zu können, wurde durch Anja Meeßen im Zuge ihrer Bachelorarbeit die Deletion von *PaAtg8* in einem $\Delta PaKu70$ -Stamm durchgeführt (Meeßen 2018). Diesem Stamm fehlt PaKU70, ein Protein des DNA-Reparatursystems, wodurch effizientere homologe Rekombination stattfindet und das zusätzlich zu deletierende Gen einfacher durch eine Resistenzkassette ersetzt werden kann (El-Khoury et al. 2008). Durch den Verlust von PaKU70 ist der Deletionsstamm jedoch anfälliger für Mutationen und eine mögliche Akkumulation von DNA-Schäden würde die anschließenden Untersuchungen beeinträchtigen. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Kreuzung des Wildstamms mit $\Delta PaAtg8/\Delta PaKu70$ um das *PaKu70*-Endogen wieder einzubringen. Der Stamm $\Delta PaAtg8/\Delta PaKu70$ basiert auf der Transformante T1-A1, welche in der zuvor durchgeführten Bachelorarbeit erstellt und identifiziert wurde.

Die Erstellung des *PaAtg8*-Deletionsstammes wurde durch eine Southern Blot-Analyse mit Hilfe einer Sonde für die Phleomycinresistenzkassette verifiziert, da in $\Delta PaKu70$ das Gen von PaKU70 durch eine Phleomycinresistenzkassette ersetzt wurde (Abbildung S1 A). Durch

die Untersuchung mit Hilfe eines Southern Blots zeigt sich, dass die Kreuzung mit dem Wildtyp erfolgreich war und in $\Delta PaAtg8$ kein Signal für die Phleomycinresistenzkassette des $\Delta PaKu70$ -Stammes vorliegt.

Zunächst erfolgte eine phänotypische Charakterisierung, eine Bestimmung der Lebensspanne und die Analyse der Wachsrates von $\Delta PaAtg8$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

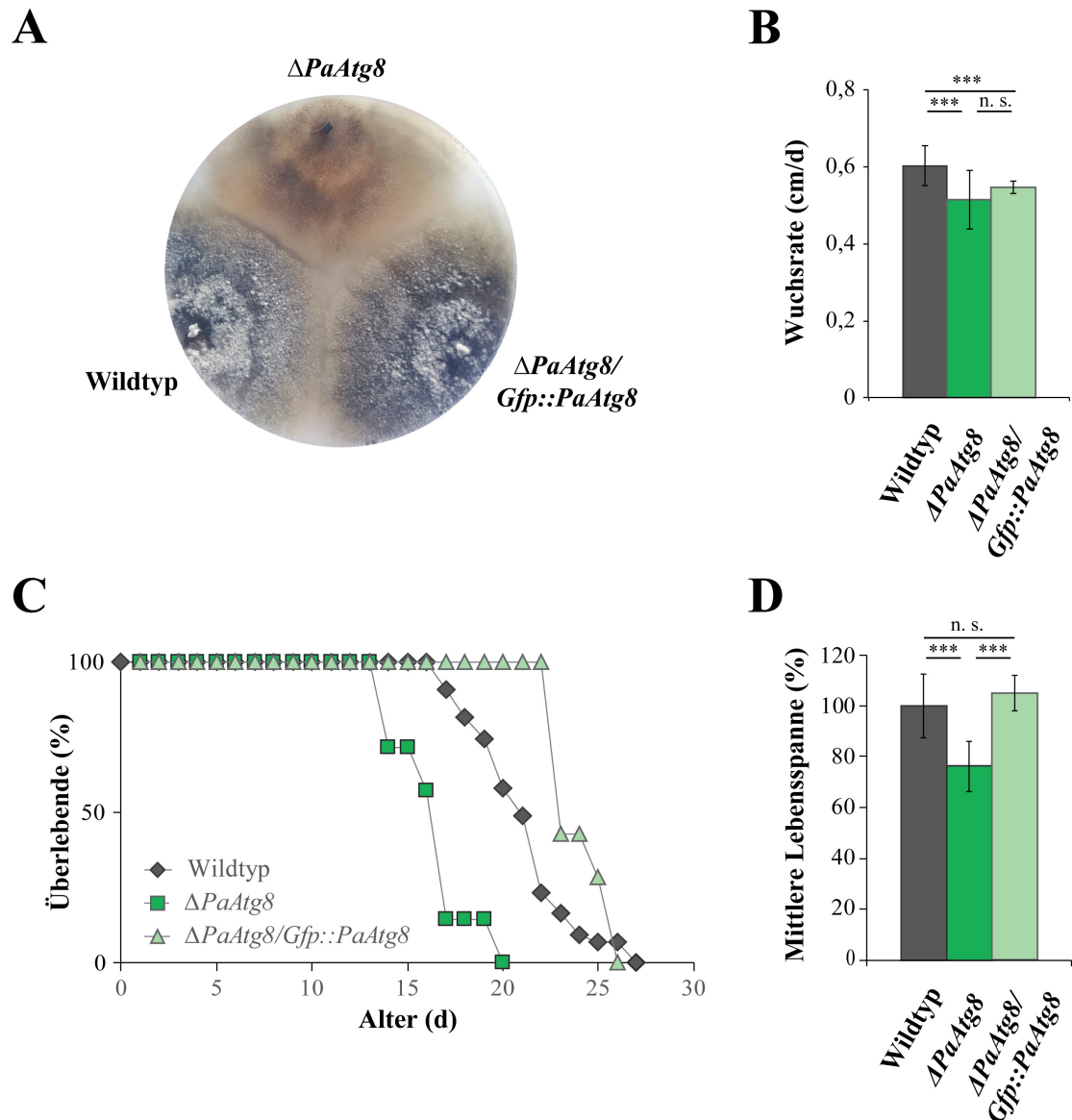


Abbildung 7: Der Verlust von PaATG8 führt zu hellem Myzel, einer verringerten Wachsrates und einer verkürzten Lebensspanne.

(A) Phänotyp des Wildtyps, $\Delta PaAtg8$, sowie $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ nach 10 Tagen Wachstum auf M2-Medium. (B) Wachsrates, Lebensspanne (C) und die relative mittlere Lebensspanne (D) der drei untersuchten Stämme auf M2-Medium nach Keimung für 2 Tage auf BMM mit Ammoniumacetat. Untersucht wurde der Wildtyp (n=43), der Komplementationsstamm $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ (n=7) und $\Delta PaAtg8$ (n=7). Für die Analyse der relativen mittleren Lebensspanne wurde der Wildtyp auf 100 % gesetzt und die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test (***) = $p \leq 0,001$).

Bei der Betrachtung des Phänotyps der $PaAtg8$ -Deletionsmutante zeigt sich, dass das Myzel

eine schwächere Pigmentierung im Vergleich zum Wildstamm aufweist (Abbildung 7 A). Ebenso wird bei dieser Mutante erheblich weniger Luftmyzel ausgebildet. Bei der Arbeit mit $\Delta PaAtg8$ zeigte sich, dass die weibliche Fertilität beeinträchtigt war (nicht dargestellt). Dies entspricht auch den Befunden des von Pinan-Lucarré et al. (2003) beschriebenen *PaAtg8*-Deletionsstamm, wo aufgrund einer fehlenden Ausbildung der Protoperithezien, wie die weiblichen Reproduktionsorgane von *P. anserina* genannt werden, die Stämme weiblich steril sind. Daher wurde in den nachfolgenden Experimenten zur eine Kreuzung von $\Delta PaAtg8$ mit dem Wildstamm durchgeführt, um Sporen zu gewinnen. Zur Identifikation der monokaryotischen Deletionsstämme, wurde bei allen Sporen eine Überprüfung der Hygromycin-Resistenz durchgeführt.

Die Untersuchung der Wachsrates von $\Delta PaAtg8$ zeigt ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildstamm (Abbildung 7 B). Die Wachsrates ist dabei in dem Deletionsstamm um 15 % vermindert. In vorherigen Arbeiten zu $\Delta PaAtg8$ wurde von Pinan-Lucarré et al. (2003) zwar die Wachsrates bestimmt, jedoch nicht die Lebensspanne dieses Deletionsstammes. Da *P. anserina* ein Modellorganismus der Alternsforschung ist, lag es nahe, eine Analyse der Lebensspanne durchzuführen. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 C und D dargestellt. In der Lebensspannenanalyse zeigt sich, dass der Verlust von PaATG8, vergleichbar zu anderen Autophagiemutanten, zu einer deutlichen Reduktion der Lebensspanne führt. Während der Wildtyp in dem vorliegenden Experiment ein maximales Alter von 26 Tagen erreichte, konnte der $\Delta PaAtg8$ -Stamm nur maximal 20 Tage alt werden (Abbildung 7). Bei der Betrachtung der mittleren Lebensspanne zeigt sich, dass die Lebensspanne von 21 Tagen beim Wildtyp auf 16 Tage in $\Delta PaAtg8$ verringert ist und somit um 14 % verkürzt ist (Abbildung 7 D).

Es ist anzunehmen, dass die Beeinträchtigungen, welche in $\Delta PaAtg8$ festgestellt wurden, auf den Verlust von PaATG8 zurückzuführen sind. Dennoch ist es möglich, dass es bei der Erstellung der Mutante zu unerwünschten Ereignissen kam, welche den beobachteten Phänotyp bewirken. Um dies ausschließen zu können, wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt. Dazu erfolgte die Erstellung einer Doppelmutante $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ durch die Kreuzung des Deletionsstammes mit *Gfp::PaAtg8*. Dieser Stamm enthält eine Kopie des *PaAtg8*-Gens an dessen 5'-Ende *Gfp* angefügt wurde. Ursprünglich wurde dieser Stamm zur mikroskopischen Analyse von Autophagosomen verwendet (Knuppertz et al. 2014). Die

Verifizierung von $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ ist in Abbildung S1 B dargestellt.

Der Phänotyp von $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ zeigt ein im Vergleich zu $\Delta PaAtg8$ deutlich dunkleres Myzel mit mehr Luftmyzel, wodurch die Doppelmutante insgesamt der Optik des Wildtyps entspricht (Abbildung 7 A). $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$ hat zwar ein etwas schnelleres Wachstum als $\Delta PaAtg8$, wie die Untersuchung der Wachsrates zeigt, allerdings wächst der Stamm im Vergleich zum Wildtyp dennoch etwa 9 % langsamer (Abbildung 7 B). Bei der Betrachtung der Lebensspanne weist die Doppelmutante wieder eine Wildtyp-ähnliche Lebensspanne auf (Abbildung 7 C, D). Somit komplementiert GFP::PaATG8 den Phänotyp der Deletionsmutante und es kann daher angenommen werden, dass die Deletion von *PaAtg8* die Ursache der verkürzten Lebensspanne ist und nicht ein möglicher Nebeneffekt der durchgeführten Transformation ist.

Insgesamt bestätigen diese Befunde, dass auch PaATG8 für den Phänotyp, die Wachsrates und zur Aufrechterhaltung der normalen Lebensspanne von *P. anserina* relevant ist.

3.1.1 Untersuchung der PaATG8-unabhängigen nicht-selektiven Autophagie

In den zuvor durchgeführten Studien zu PaATG8 wurde gezeigt, dass dieses Protein auch in *P. anserina* in der autophagosomalen Membran lokalisiert ist und durch autophagische Prozesse zur Vakuole transportiert und dort abgebaut wird (Pinan-Lucarré et al. 2005, 2003). Jedoch ist bisher ungeklärt, ob PaATG8 auch in *P. anserina* eine zentrale Rolle in der Autophagosomenbildung und somit der Autophagie einnimmt, wie es die Untersuchungen in anderen Organismen zeigen, wie zum Beispiel bei *S. cerevisiae*.

Um den Einfluss von PaATG8 auf die Autophagie von *P. anserina* untersuchen zu können, erfolgte die Erstellung einer Doppelmutante mit dem Autophagie-Reporterstamm *PaSod1::Gfp* (Abbildung S1 C). Dieser Reporterstamm wurde bereits in vorherigen Studien in *P. anserina* etabliert und kann zur Untersuchung der nicht-selektiven Autophagie verwendet werden (Knuppertz et al. 2014). Bei *PaSod1::Gfp* wird eine GFP-markierte Variante der zytoplasmatisch lokalisierten Superoxiddismutase 1 (PaSOD1) synthetisiert (Zintel et al. 2010). Mit Hilfe dieses Fusionsprotein kann der sogenannten „GFP-cleavage-Assay“ durchgeführt werden. PaSOD1 wird als zytoplasmatisches Protein durch die nicht-selektive Autophagie zur Vakuole transportiert und dort abgebaut. Durch die Verwendung der GFP-markierten Variante

ist es möglich quantitativ diesen Prozess nachzuverfolgen (Knuppertz et al. 2014). Nach dem Transport von PaSOD1::GFP zur Vakuole kommt es zur Degradation des Reporterproteins, während die GFP-Komponente stabil bleibt. Mit Hilfe einer Western Blot-Analyse kann durch die Verwendung eines GFP-Antikörpers anschließend bestimmt werden, wieviel Fusionsprotein in der Zelle vorhanden ist und wieviel „freies GFP“ vorliegt. Dabei zeigt das Fusionsprotein in der Western Blot-Analyse eine Bande bei etwa 40 kDa, während das „freie GFP“ bei etwa 24 kDa identifiziert werden kann. Durch diese Methode dient das „freie GFP“ als Maßeinheit für die Rate der nicht-selektiven Autophagie.

Um die nicht-selektive Autophagie in $\Delta PaAtg8$ analysieren zu können, wurden Sporen von $\Delta PaAtg8/PaSod1::Gfp$, sowie $PaSod1::Gfp$ als Wildtypkontrolle, isoliert. Nach einer zweitägigen Keimung auf BMM mit Ammoniumacetat wurden die Stämme auf M2-Medium zur Alterung kultiviert und vor Isolation des Gesamtproteins von 7 und 14 Tage alten Stämmen erfolgte jeweils eine Inkubation für 3 Tage in CM-Medium. Mit diesen Gesamtproteinproben wurde anschließend die Western Blot-Analyse durchgeführt und die Menge des „freien GFPs“ quantitativ bestimmt (Abbildung 8).

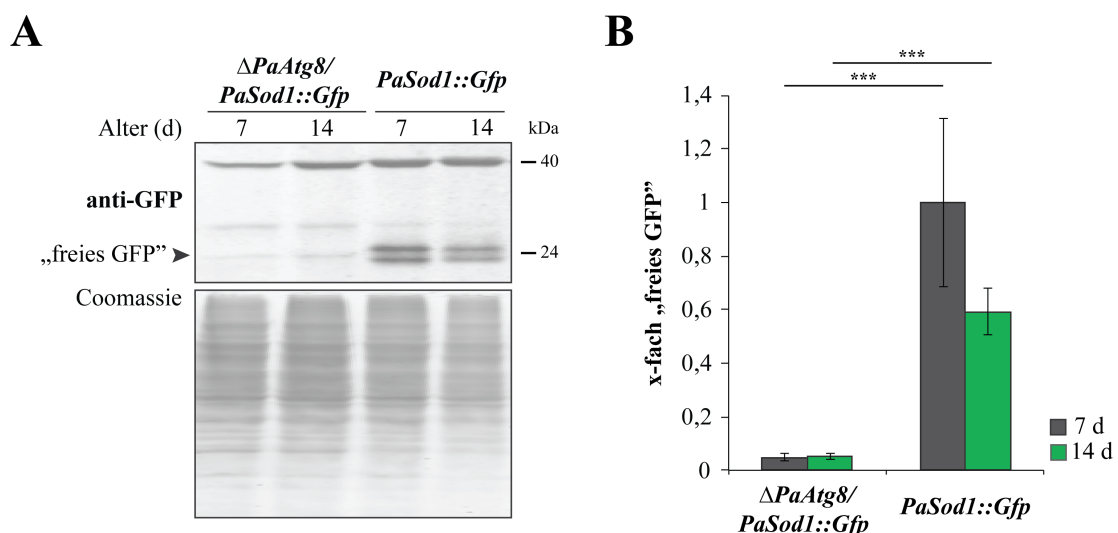


Abbildung 8: PaATG8 wird für die nicht-selektiven Autophagie benötigt.

(A) Western Blot-Analyse zur Bestimmung des „freien GFPs“ mit anti-GFP-Antikörper durch das zytoplasmatisch lokalisierte Reporterprotein PaSOD1::GFP mit je 50 μ g Gesamtprotein aus 7- und 14-Tage alten $\Delta PaAtg8/PaSod1::Gfp$ und $PaSod1::Gfp$ -Kontrollstämmen. Die Auftrennung erfolgte in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel und einer anschließenden Übertragung auf eine PVDF-Membran. **(B)** Quantifizierung der Western Blot-Analysen aus jeweils n=4 Proben. Die Normalisierung erfolgte auf das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Die Menge des „freien GFPs“ der 7 Tage alten Wildtypkontrolle wurde auf 1 gesetzt und die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test (***) = $p \leq 0,001$.

Wie bereits von Knuppertz et al. (2014) gezeigt, hat der Wildstamm von *P. anserina* auch unter Normalbedingungen eine basale nicht-selektive Autophagie (Abbildung 8 A). Die Doppelbande des „freien GFPs“ ist dabei charakteristisch für den Reporterstamm (Knuppertz et al. 2014). In *PaSod1::Gfp* ist die Menge des „freien GFPs“ bei den 7 und 14 Tage alten Stämmen nicht signifikant verändert, da es sich hierbei um junge und mittelalte Stämme handelt und erst während der Alterung ein Anstieg zu erwarten ist (Abbildung 8 B). Bei der Betrachtung des *PaAtg8*-Deletionsstamms kann im Western Blot bei beiden untersuchten Altersstadien neben der Bande des Fusionsproteins bei etwa 40 kDa auf Höhe von 24 kDa eine sehr schwache Bande festgestellt werden (Abbildung 8 A). Die Analyse der nicht-selektiven Autophagie zeigt, dass der Verlust des *PaAtg8*-Gens in 7 Tage alten Stämmen zu einer statistisch hochsignifikanten Reduktion der Autophagie führt. Dabei entspricht die Autophagierate in $\Delta PaAtg8$ nur noch 1/20 der Autophagie des Kontrollstamms. Während der Alterung von $\Delta PaAtg8$ von 7 auf 14 Tage kann keine Veränderung der Autophagierate festgestellt werden, da weiterhin nahezu keine Autophagie in dem Deletionsstamm vorhanden ist.

Insgesamt zeigt sich, dass PaATG8 auch in *P. anserina* eine zentrale Rolle in der nicht-selektiven Autophagie hat. Der Verlust von PaATG8 führt zu einer starken Beeinträchtigung des autophagischen Abbaus von zytoplasmatischen Proteinen in der Vakuole und somit ist dieses Autophagosomen-assoziierte Protein essenziell für diesen zellulären Abbau- und Recyclingweg.

3.1.2 Betrachtung der Mitophagie nach Verlust von PaATG8

Neben der nicht-selektiven Form der Autophagie, sind vor allem die selektiven Autophagieformen im Fokus der Forschung. Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Mitophagie ein, der autophagische Abbau von Mitochondrien. Mitochondrien sind aufgrund der oxidativen Phosphorylierung anfällig für Schädigungen und die Zelle hat verschiedene Systeme zur Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion. Wenn es im Laufe der Alterung zu einer Akkumulation der mitochondrialen Schäden kommt, werden die Mitochondrien selektiv von Autophagosomen umschlossen und in der Vakuole abgebaut.

Um einen tieferen Einblick in die Mitophagie von *P. anserina* zu erhalten, sollte untersucht werden, ob durch den Verlust des Autophagosomen-assoziierten Proteins PaATG8 eine Beeinträchtigung der Mitophagie vorliegt und ob der Abbau von Mitochondrien ausschließlich

über Autophagosomen erfolgt.

Um diese Untersuchung durchführen zu können, erfolgte die Erstellung einer Doppelmutante $\Delta PaAtg8/PaSod3^{H26L}::Gfp$ (Abbildung S1 D). Dabei ist $PaSod3^{H26L}::Gfp$ ein Reporterstamm der Mitophagie. Zur Untersuchung des mitochondrialen Abbaus in der Vakuole wird ein Fusionsprotein mit einer inaktiven Form der mitochondrialen Superoxiddismutase (PaSOD3) verwendet. $PaSod3^{H26L}::Gfp$ kann, wie zuvor für $PaSod1::Gfp$ beschrieben, im „GFP-cleavage-Assay“ verwendet werden (Knuppertz et al. 2014, 2017). Die Kultivierung von $\Delta PaAtg8/PaSod3^{H26L}::Gfp$ und $PaSod3^{H26L}::Gfp$ erfolgte analog zu der Untersuchung der nicht-selektive Autophagie der $PaAtg8$ -Deletionsmutante (siehe Seite 68). Nach Erhalt der Gesamtproteinextrakte wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt und anschließend die Menge des „freien GFPs“ nach Inkubation mit einem anti-GFP-Antikörper bestimmt (Abbildung 9).

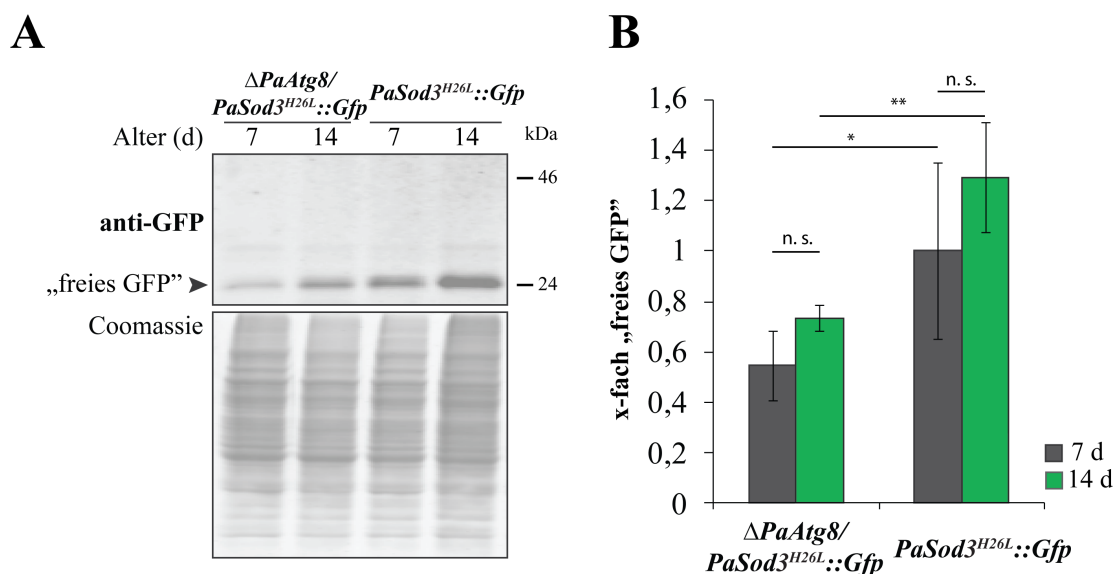


Abbildung 9: Ein PaATG8-unabhängiger Abbau eines mitochondrialen Proteins ist möglich.

(A) Western Blot-Analyse nach einer 12 %-igen SDS-PAGE mit je 50 μ g Gesamtprotein aus 7- und 14-Tage alten $\Delta PaAtg8/PaSod3^{H26L}::Gfp$ und Kontrollstämmen ($PaSod3^{H26L}::Gfp$) und Detektion mit anti-GFP-Antikörper. (B) Quantifizierung der Western Blot-Analysen aus $\Delta PaAtg8$ (n=5, 3) und des Kontrollstamms (n=3, 4). Die Normalisierung erfolgte auf das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Die Menge des „freien GFPs“ der 7 Tage alten Wildtypkontrolle wurde auf 1 gesetzt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger *t*-Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$).

Bei der Verwendung des $PaSod3^{H26L}::Gfp$ -Reporterstammes kann, wie zuvor bei Knuppertz et al. (2017) beschrieben, kein Fusionsprotein festgestellt werden (Abbildung 9 A). Die Häufigkeit von mitochondrialen Proteinen in Gesamtprotein ist unter der Detektionsgrenze, nur durch

den Transport in die Vakuole kommt es zu einer Akkumulation des GFP-Proteins, sodass eine Detektion möglich ist Knuppertz et al. (2017). In der verwendeten Wildtypkontrolle zeigt sich bei 7 und bei 14 Tage alten Stämmen die erwartete Bande des „freien GFPs“ bei 24 kDa, da in *P. anserina* Mitophagie auch unter Normalbedingungen stattfindet (Abbildung 9 A). Während der Alterung von *PaSod3^{H26L}::Gfp* kann eine signifikante Zunahme der Mitophagie festgestellt werden (Abbildung 9 B). Bei der Betrachtung des *PaAtg8*-Deletionsstammes ist in beiden untersuchten Altersstadien eine Bande bei 24 kDa vorhanden (Abbildung 9 A). Es kommt somit in diesem Stamm zu keinem vollständigen Verlust des Abbaus von mitochondrialen Proteinen in der Vakuole. Die Menge des „freien GFPs“ in $\Delta PaAtg8$ bei 7 Tage alten Stämmen entspricht dem 0,46-fachen des Kontrollstamm. Bei 14 Tage alten Stämmen führt der Verlust von PaATG8 ebenfalls zu einem im Vergleich zum Kontrollstamm statistisch signifikant reduziertem Abbau von PaSOD3^{H26L}::GFP in der Vakuole (Abbildung 9 B). Es zeigt sich, dass der Verlust von PaATG8 zu einer Reduktion der Mitophagie führt, jedoch können weiterhin, wenngleich deutlich verringert, mitochondriale Proteine in die Vakuole transportiert und degradiert werden. Die Mitophagie ist somit nur partiell von PaATG8 abhängig.

3.2 Untersuchung des putativen Autophagie-relevanten Proteins

PaATG11

Die Untersuchungen des *PaAtg8*-Deletionsstammes haben gezeigt, dass eine partiell PaATG8-unabhängige Form der Mitophagie existiert, während die nicht-selektive Autophagie vollständig von PaATG8 abhängig zu sein scheint. Diese erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass für den Abbau von geschädigten Mitochondrien alternative Abbauwege existieren, um einen Ausfalls der Autophagosomenbildung kompensieren zu können. Um einen tieferen Einblick in die Autophagie und den Einfluss der Autophagosomen zu erhalten, erfolgte die Analyse einer *PaAtg11*-Deletionsmutante. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit dargelegt, stellt PaATG11 ein wichtiges Protein des ATG1-Komplexes unter anderem bei *S. cerevisiae* dar. Dabei wird es zumeist als Adapterprotein in der selektiven Autophagie betrachtet, während der Zusammenhang von ATG11 mit der nicht-selektiven Autophagie noch viele Fragen aufwirft. Für die Analyse der Funktion von PaATG11 in *P. anserina* wurde zunächst

eine *PaAtg11*-Deletionsmutante erstellt und im Anschluss der Einfluss auf die nicht-selektive Autophagie und Mitophagie untersucht.

Zur Erstellung des *PaAtg11*-Deletionsstammes hat Anja Meeßen in ihrer Bachelorarbeit ein *PaAtg11*-Deletionsplasmid zur Transformation in den $\Delta PaKu70$ -Stamm erstellt (Meeßen 2018). Mit Hilfe dieses Plasmides konnte im Zuge dieser Arbeit eine erfolgreiche Transformation durchgeführt werden und im Anschluss wurde, wie bereits bei der Erstellung des $\Delta PaAtg8$ -Stammes beschrieben, *PaKu70* wieder eingebracht um die Akkumulation von DNA-Schäden zu verhindern (Abbildung S1 E). Nach der erfolgreichen Erstellung des *PaAtg11*-Deletionsstammes konnte dieser im Folgenden analysiert und charakterisiert werden. Hierzu wurde der Phänotyp, die Lebensspanne und die Wachstumsrate von $\Delta PaAtg11$ betrachtet (Abbildung 10).

Bei dem Anblick des Myzels von $\Delta PaAtg11$ kann kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden, somit hat der Verlust von PaATG11 keinen erkennbaren Einfluss auf den Phänotyp von *P. anserina* (Abbildung 10 A). Auch die Wachstumsrate des $\Delta PaAtg11$ -Stammes ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert und entspricht in beiden Fällen 0,6 cm/d (Abbildung 10 B). Die Analyse der Lebensspanne zeigt ebenfalls keinen Unterschied zwischen der *PaAtg11*-Deletionsmutante und dem Wildtyp (Abbildung 10 C, D). Die mittlere Lebensspanne beträgt bei beiden Stämmen 21 Tage, sodass kein Unterschied bei der relativen mittleren Lebensspanne vorliegt (Abbildung 10 D).

Der Verlust von PaATG11 hat keine Auswirkungen auf das Aussehen, die Wachstumsrate und Lebensspanne von $\Delta PaAtg11$. Damit unterscheidet sich PaATG11 von den bisher in *P. anserina* beschriebenen Autophagieproteinen wie PaATG1, PaATG8 und PaATG24 (Brunner 2016; Knuppertz et al. 2014; Pinan-Lucarré et al. 2005, 2003).

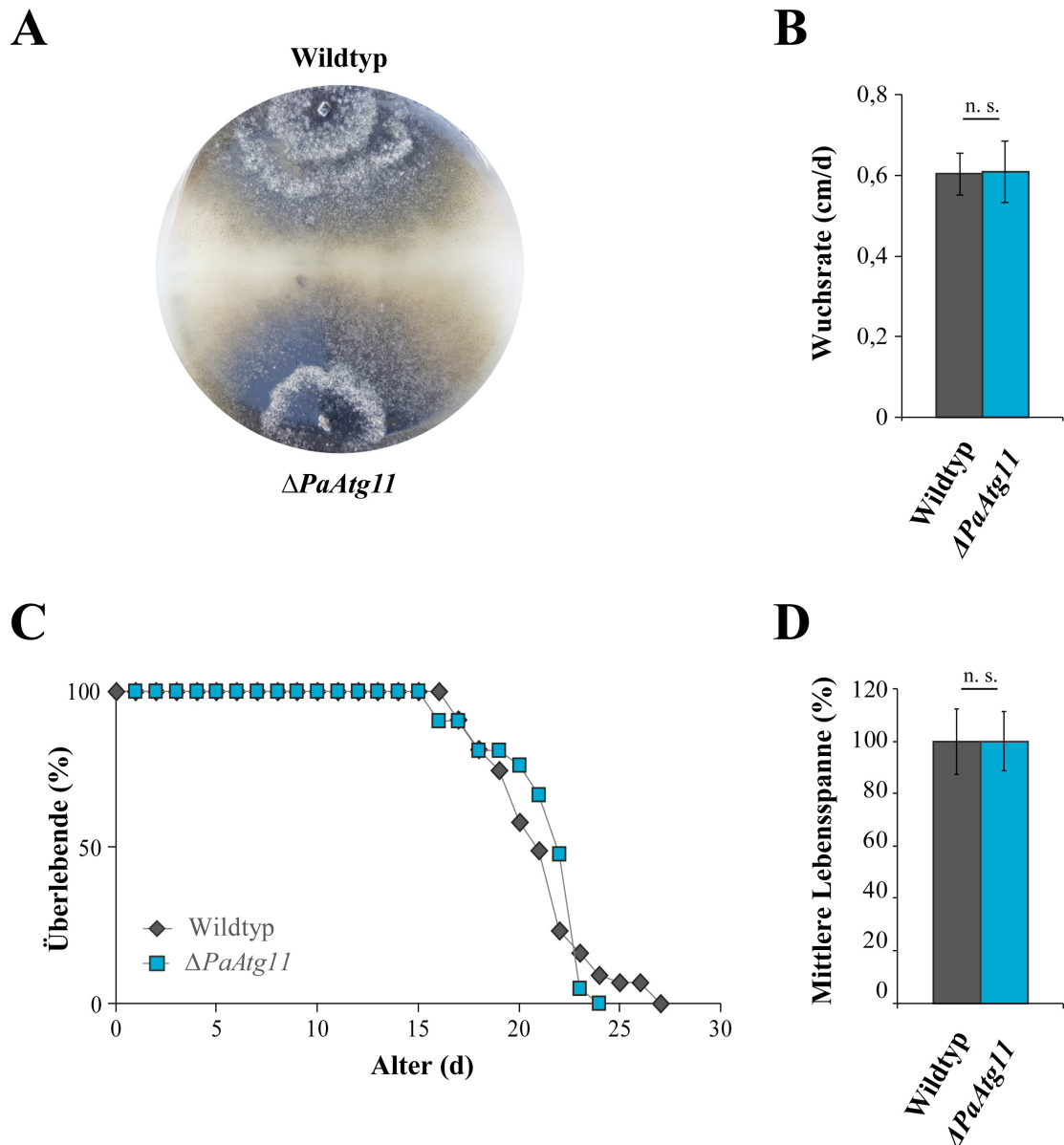


Abbildung 10: Charakterisierung der *PaAtg11*-Deletionsmutante.

(A) Der Phänotyp des Wildstamms und von $\Delta PaAtg11$ nach 10 Tagen Wachstum auf M2-Medium. (B) Analyse der Wuchsrates, der Lebensspanne (C) und der mittleren Lebensspanne (D) des Wildtyps (n=43) im Vergleich zum *PaAtg11*-Deletionsstamm (n=21). Zur Analyse der relativen mittleren Lebensspanne wurde der Wildtyp auf 100 % gesetzt und die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test (n. s. = nicht signifikant).

3.2.1 Analyse der nicht-selektiven und selektiven Autophagie nach Verlust von PaATG11

In *S. cerevisiae*, *C. albicans* und weiteren Organismen ist ATG11 ein Protein der selektiven Autophagie (Cui et al. 2019; Kim et al. 2001; Shintani und Klionsky 2004). Aufgrund des Wildtyp-ähnlichen Phänotyps von $\Delta PaAtg11$ ist es möglich, dass nur der Verlust der nicht-selektiven Autophagie den Phänotyp der bisher bekannten Autophagiemutanten verursacht. Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass PaATG11

in *P. anserina* nur einen geringen Einfluss auf die selektive Autophagie hat und der für *S. cerevisiae* beschriebene Signalweg der Mitophagie nicht so strikt konserviert ist wie angenommen. Um dies näher zu untersuchen, wurde die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie im *PaAtg11*-Deletionsstamm analysiert. Hierzu erfolgte, wie auch zuvor für $\Delta PaAtg8$, die Erstellung einer Doppelmutante mit dem Reporterstamm *PaSod1::Gfp* zur Betrachtung der nicht-selektiven Autophagie in $\Delta PaAtg11$, sowie eine Doppelmutante $\Delta PaAtg11/PaSod3^{H26L}::Gfp$ zur Untersuchung der Mitophagie (Abbildung S1 F, G). Mit Hilfe dieser Stämme wurde das „freie GFP“ als Maß für die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie durch eine Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 11).

Die Betrachtung der nicht-selektiven Autophagie in $\Delta PaAtg11$ zeigt, dass in beiden untersuchten Altersstadien ein Abbau des Fusionsproteins in der Vakuole stattfindet (Abbildung 11 A). Allerdings kann festgestellt werden, dass eine Reduktion der Autophagierate vorhanden ist. Die Quantifizierung veranschaulicht, dass in beiden untersuchten Altersstadien die Rate der nicht-selektiven Autophagie in $\Delta PaAtg11$ um den Faktor 0,6 verringert ist im Vergleich zum Kontrollstamm (Abbildung 11 B). Somit ist PaATG11 in *P. anserina* an der nicht-selektiven Autophagie beteiligt. Der Verlust von PaATG11 führt jedoch nicht zu einem kompletten Verlust der nicht-selektiven Autophagie, sondern nur zu einer Verminderung, welcher unter Normalbedingungen keinen Einfluss auf den Phänotyp und die Lebensspanne von $\Delta PaAtg11$ hat.

Die mit Hilfe des *PaSod3^{H26L}::Gfp*-Reporterstamms durchgeführte Analyse zur Bestimmung der Mitophagierate der *PaAtg11*-Deletionsmutante zeigt, dass auch kein vollständiger Verlust der Mitophagie vorliegt (Abbildung 11 C). Es kommt auch in dem Deletionsstamm zur Bildung des „freien GFPs“. Somit führt der Verlust von PaATG11 auch bei der Betrachtung der Mitophagie zu einer Reduktion des Abbaus in der Vakuole.

Bei 7 Tage alten Stämmen zeigt sich in $\Delta PaAtg11$ eine Verringerung der Menge an „freiem GFP“ um 34 % im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Während der Alterung des Wildtyps kommt es in einem mittleren Lebensalter zu einer vermutlich entwicklungsbiologisch begründeten Erhöhung der Mitophagierate (Knuppertz et al. 2014). Diese Erhöhung kann in $\Delta PaAtg11$ nicht festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass PaATG11 neben der Beteiligung an einer effizienten basalen Mitophagie ein wichtiger Faktor bei einer Adaption und Modulation der

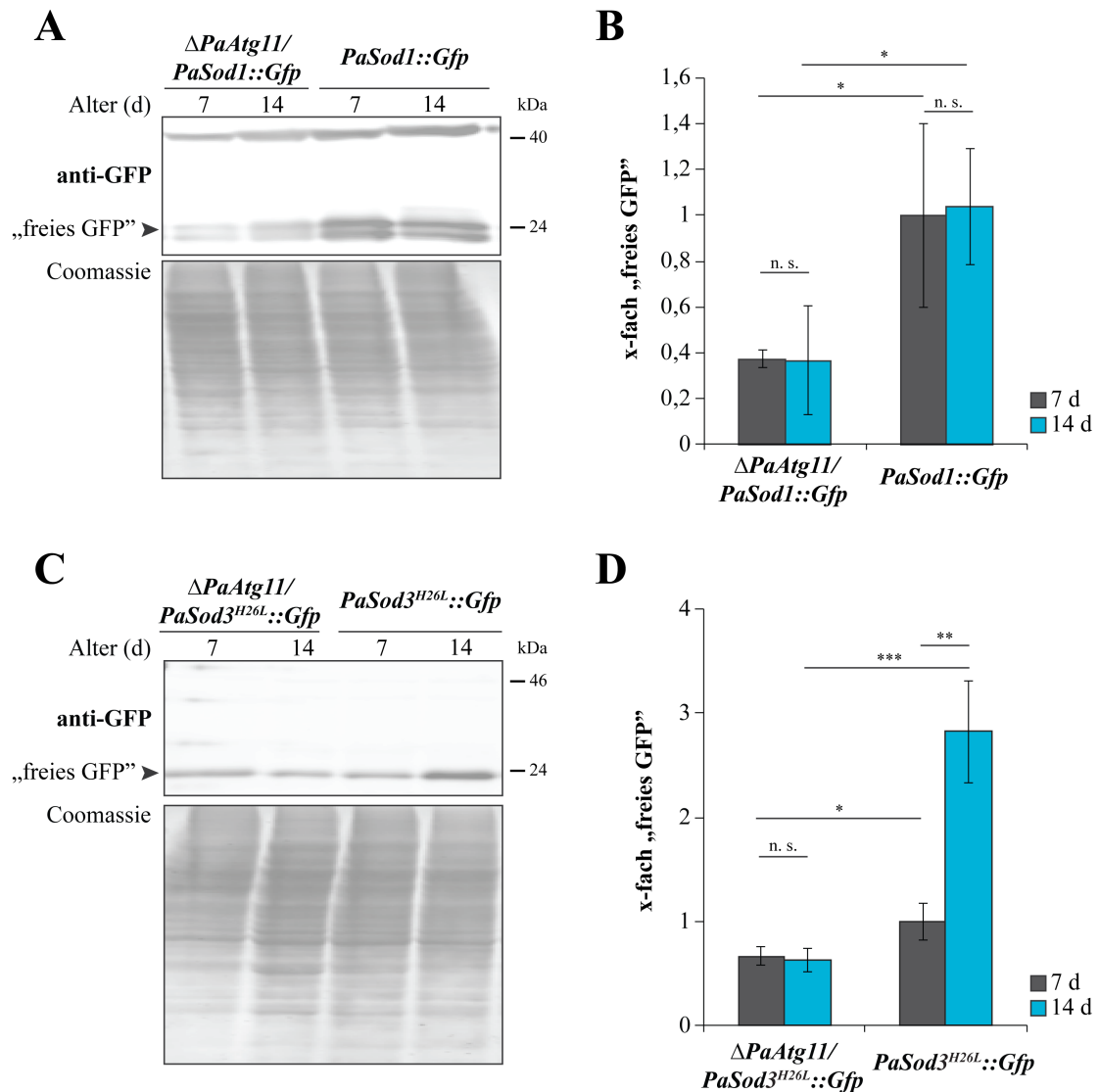


Abbildung 11: PaATG11 ist an der nicht-selektiven Autophagie und der Mitophagie beteiligt.

(A) Western Blot-Analyse zur Bestimmung des „freien GFPs“ mit anti-GFP Antikörper durch das zytoplasmatisch lokalisierte Reporterprotein PaSOD1::GFP mit je 50 μ g Gesamtein aus 7- und 14-Tage alten $\Delta PaAtg11/ PaSod1::Gfp$ und Kontrollstämmen. (B) Quantifizierung der Western Blot-Analysen von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg11/ PaSod1::Gfp$ ($n=3$, jeweils), sowie $PaSod1::Gfp$ ($n=4, 5$). (C) Analyse der Mitophagie mit $PaSod3^{H26L}::Gfp$ als Reporterstamm. Die Auftrennung von je 50 μ g Gesamtein erfolgte durch eine 12 %-ige SDS-PAGE und nach Western Blot die Detektion des GFPs mit einem anti-GFP-Antikörper. (D) Quantifizierung der Mitophagierate nach Verlust von PaATG11 ($n=4, 5$) und im Kontrollstamm ($n=3$, jeweils). Die Menge des „freien GFPs“ der 7 Tage alten Wildtypkontrollen wurde jeweils auf 1 gesetzt und die Normalisierung erfolgte auf die Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgele. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger t -Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

Mitophagiemenge bei wechselnden Bedingungen darstellen könnte.

3.3 Die Rolle des sortierenden Nexins PaATG24 in *P. anserina*

Für eine detaillierte Untersuchung der Mitophagie würde die Untersuchung eines Mitophagierezeptorproteins wie ScATG32, welches für *S. cerevisiae* beschrieben ist, einen bedeutenden Einblick in die zelluläre Erkennung von geschädigten Mitochondrien ermöglichen. Jedoch konnte bisher in *P. anserina*, wie auch in vielen anderen Organismen, kein Sequenzhomolog zu ScATG32 identifiziert werden. In verschiedenen vorhergehenden Studien wurde daher versucht Funktionshomologe dieses Proteins in anderen Pilzen zu identifizieren. Ein möglicher Kandidat für ein derartiges Mitophagierezeptorprotein ist ATG24, welches auch als SNX4 (Sortierendes Nexin 4) bezeichnet wird. In einer Studie in *M. oryzae* konnte der Phänotyp einer *MoAtg24*-Deletionsmutante durch *ScAtg32* komplementiert werden (He et al. 2013). Um einen Einblick der möglichen Beteiligung von PaATG24 in der Mitophagie zu erhalten, sollte zunächst untersucht werden, ob PaATG24 spezifisch an der selektive Autophagie beteiligt ist und ob das Protein somit möglicherweise ein Funktionshomolog für ScATG32 auch in *P. anserina* darstellt.

Zur näheren Untersuchung der Funktion von PaATG24 wurde bereits in vorherigen Abschlussarbeiten der Arbeitsgruppe eine *PaAtg24*-Deletionsmutante erstellt und initial charakterisiert (Brunner 2016; Schürmanns 2015). Bei der Arbeit mit dem *PaAtg24*-Deletionsstamme fiel auf, dass ähnlich wie bei zuvor beschriebenen Autophagiemutanten $\Delta PaAtg1$ und $\Delta PaAtg8$ die Fertilität dieses Stammes beeinträchtigt ist. Dabei ist jedoch ungewöhnlich, dass bei $\Delta PaAtg24$ die männliche Fertilität stark eingeschränkt ist und nahezu keine Spermastien gebildet werden (persönliche Mitteilung A. Hamann, Henkel et al., 2020). Auf den zuvor durchgeführten Untersuchungen aufbauend, erfolgte eine Vertiefung der Charakterisierung von $\Delta PaAtg24$, welche in Abbildung 12 dargestellt ist.

Dabei zeigt sich bei $\Delta PaAtg24$ ein Phänotyp, welcher bei verschiedenen Autophagiemutanten beschrieben ist mit einer hellen Pigmentierung des Myzels und der Sporen, sowie einer verkürzten Lebensspanne und Wachsrate (Abbildung 12). Der Verlust von PaATG24 führt zu einer Verkürzung der Wachsrate um 39 %, sowie zu einer Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 12 B-D). Die Mutante $\Delta PaAtg24/PaAtg24_Ex3$ stellt ein

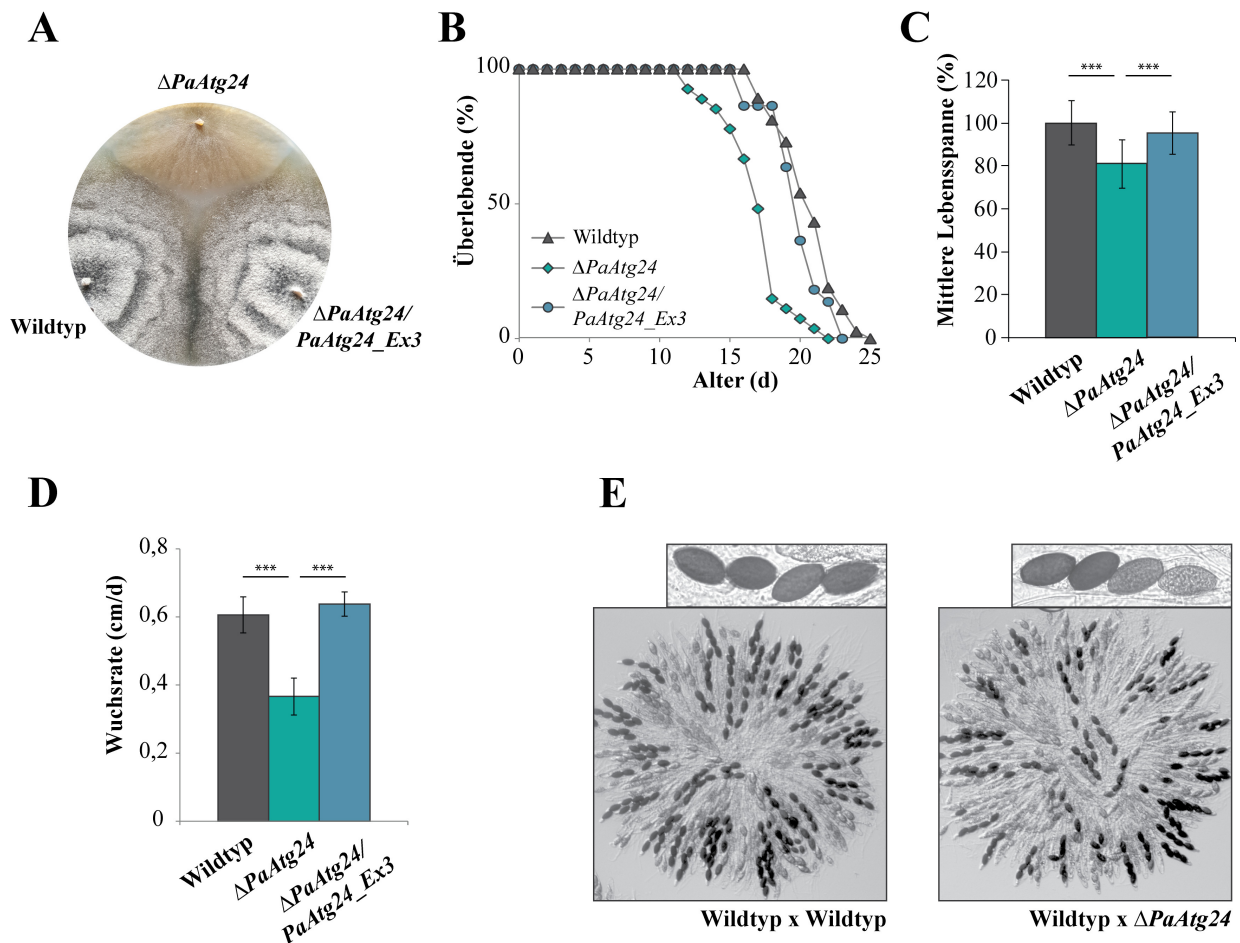


Abbildung 12: Charakterisierung der *PaAtg24*-Deletionsmutante.

(A) Der Phänotyp des Wildstamms, des *PaAtg24*-Deletionsstammes, sowie des Komplementationsstammes $\Delta PaAtg24/PaAtg24_Ex3$ nach 10 Tagen Wachstum auf M2-Medium. (B) Lebensspanne, Mittlere Lebensspanne (C) und Wachstumsrate (D) des Wildtyps (n=23), $\Delta PaAtg24$ (n=25) und $\Delta PaAtg24/PaAtg24_Ex3$ (n=23). (E) Darstellung eines repräsentativen Fruchtkörperinhalts von einer Wildtypkreuzung, sowie einer Kreuzung des Deletionsstammes mit dem Wildtyp. Zur Analyse der mittleren Lebensspanne wurde der Wildtyp auf 100 % gesetzt und die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test (***) = $p \leq 0,001$). Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

Komplementationsstamm dar, bei welchem das *PaAtg24*-Endogen mit dem *PaAtg24*-Promotor in den *PaAtg24*-Deletionsstamm eingebracht wurde (Brunner 2016). Dieser Stamm zeigt einen Phänotyp, eine Wachstumsrate und eine Lebensspanne, die zum Wildtyp vergleichbar ist (Abbildung 12). Dadurch kann geschlossen werden, dass die Beeinträchtigungen der *PaAtg24*-Deletionsmutante auf den Verlust des sortierenden Nexins zurückzuführen sind. Somit ist festzustellen, dass PaATG24 für den Phänotyp, die Wachstumsrate und zur Aufrechterhaltung der normalen Lebensspanne von *P. anserina* benötigt wird und der Verlust dieses sortierenden Nexins den für Autophagiemutanten in *P. anserina* typischen Phänotyp aufweist.

3.3.1 Bestimmung der nicht-selektiven und selektiven Autophagie in $\Delta PaAtg24$

In den Untersuchungen von ATG24 in anderen Organismen wie *S. cerevisiae* oder *S. pombe* ist bekannt, dass der Verlust des sortierenden Nexins alleine keinen Einfluss auf die nicht-selektive Autophagie hat (Nice et al. 2002; Ohashi und Munro 2010; Zhao et al. 2016). Um zu untersuchen, ob dies auch in *P. anserina* der Fall ist, wurde die nicht-selektive Autophagie in $\Delta PaAtg24$ mit dem *PaSod1::Gfp*-Reporterstamm untersucht (Abbildung 13 A, S1 J). Nach Isolation von Gesamtprotein von 7, 9, 11 und 14 Tage alten Stämmen erfolgte die Untersuchung der nicht-selektiven Autophagie per Western Blot-Analyse (Abbildung 13 A).

Bei allen untersuchten Stämmen und Altersstadien kann eine Bande auf etwa 40 kDa festgestellt werden, welche dem Fusionsprotein PaSOD1::GFP entspricht. Bei der Betrachtung des „freien GFPs“ auf einer Höhe von 24 kDa befindet sich beim Kontrollstamm *PaSod1::Gfp* in allen vier untersuchten Altersstadien das erwartete Signal für die basale nicht-selektive Autophagie. Im Vergleich dazu ist in $\Delta PaAtg24$ altersunabhängig nur eine sehr schwache Bande zu erkennen. Somit ist PaATG24 in *P. anserina* an der nicht-selektiven Autophagie beteiligt und im Gegensatz zu den Befunden in anderen Organismen kein Protein, welches ausschließlich für die selektive Autophagie benötigt wird.

Um einen Einblick in die Mitophagie von $\Delta PaAtg24$ zu erhalten, hat Miriam Brunner im Zuge ihrer Masterarbeit eine Doppelmutante $\Delta PaAtg24/PaSod3^{H26L}::Gfp$ erstellt und in initialen Untersuchungen gezeigt, dass der Verlust von PaATG24 zu einer reduzierten Mitophagie führt (Brunner 2016). Eine Vertiefung dieser Untersuchungen erfolgte, indem weitere Altersstadien betrachtet und zusätzlich analysiert wurde, inwiefern eine Induktion der Mitophagie in dem *PaAtg24*-Deletionsstamm möglich ist (Abbildung 13 B-E). Die Untersuchung der Mitophagie unter Normalbedingungen zeigt, dass bei 7 Tage alten $\Delta PaAtg24$ -Stämmen nahezu kein Abbau von mitochondrialen Proteinen in der Vakuole stattfindet (Abbildung 13 B, C). Die Menge des „freien GFPs“ bei 7 Tage alten *PaAtg24*-Deletionsstämmen entspricht einem Bruchteil des Wildtyps, sodass die dargestellten Daten eher als deskriptiv zu betrachten sind, da aufgrund der technischen Auflösung eine Ungenauigkeit der Detektion vorliegt. Aufgrund der Vollständigkeit wurden sie hier dennoch dargestellt. Bei den 9 Tage alten Kontrollstämmen kommt es zu einem statistisch hoch-signifikanten 7-fachen Anstieg der Mitophagie im Vergleich zu den 7

Tage alten Stämmen. Ebenso kann in $\Delta PaAtg24$ ein Anstieg der Mitophagie sowohl in der Western Blot-Analyse, als auch in der Quantifizierung festgestellt werden. Die Menge des „freien GFPs“ in $\Delta PaAtg24$ ist in 9 Tage alten Stämmen weiterhin statistisch hochsignifikant reduziert im Vergleich zum Kontrollstamm. Bei dem Altersstadium der 11 Tage alten Stämme kommt es in der Wildtypkontrolle wieder zu einer Reduktion der Mitophagierate, bevor es wieder zu einem Anstieg des „freien GFPs“ bei 14 Tage kommt. Die Mitophagierate unterliegt in der Wildtypkontrolle während dieser Entwicklungsphase somit gewissen Schwankungen. Dies ist in $\Delta PaAtg24$ nicht der Fall. In diesem Stamm ist die Mitophagierate zwischen den 9 und den 11 Tage alten Stämmen nicht signifikant unterschiedlich. Erst bei der Alterung kommt es bei 14 Tage alten $\Delta PaAtg24$ -Stämmen zu einer deutlich in der Western Blot-Analyse sichtbaren und quantifizierbaren Anstieg des „freien GFPs“. Im direkten Vergleich zwischen den 14 Tage alten Kontrollstämmen und $\Delta PaAtg24$ ist die Mitophagierate in der Deletionsmutante weiterhin signifikant und deutlich erkennbar verringert. PaATG24 ist vor allen in jungen *P. anserina*-Stämmen essenziell für die Mitophagie, wie an der reduzierten Mitophagierate erkennbar ist. Dennoch liegt kein kompletter Mitophagiedefekt in der Deletionsmutante vor, da in alten Stämmen ein Abbau von mitochondrialen Proteinen in der Vakuole möglich ist. Aufgrund der begrenzten Lebensspanne von $\Delta PaAtg24$ ist 14 Tage als ein altes Altersstadium zu sehen.

Bei der in Abbildung 13 B und C dargestellten Betrachtung der Mitophagie handelt es sich um die basale Mitophagie in *P. anserina*, welche kontinuierlich beobachtet werden kann. Unter Stressbedingungen ist *P. anserina* in der Lage die Mitophagie zu erhöhen (Knuppertz und Osiewacz 2017). Durch eine Induktion der Mitophagie ist es möglich den mitochondrialen Abbau unter Stressbedingungen zu analysieren und so zu untersuchen inwiefern die Zellen in der Lage sind auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Ein Zusatzstoff im Medium, der sich als besonders geeignet für diese Untersuchungen herausgestellt hat, ist MMS (Methylmethansulfonat). Dabei handelt es sich um ein alkylierendes Agens, das zu Schäden an der mitochondrialen DNA führt wodurch es zu einer Erhöhung der Mitophagierate in *P. anserina* kommt (Acevedo-Torres et al. 2009; Beranek 1990; Knuppertz und Osiewacz 2017). Wie in Abbildung 13 D und E dargestellt ist, verursacht die Zugabe von MMS in 7 Tage alten Stämmen des Mitophagiereporterstamms $PaSod3^{H26L}::Gfp$ einen 1,7-fach stärkeren Abbau von

Mitochondrien im Vergleich zur Kultivierung bei Normalbedingungen. Bei der Kultivierung von $\Delta PaAtg24$ mit 0,009 % MMS ist die Mitophagie wie unter Normalbedingungen im Vergleich zur Wildtypkontrolle reduziert. Bei der Betrachtung der Mitophagiesteigerung in 7 Tage alten *PaAtg24*-Deletionsstämmen zeigt sich, dass durch die Zugabe von MMS ebenfalls eine 1,7-fache Erhöhung der Mitophagierate beobachtet werden kann. Da die Verwendung dieses Zusatzstoffes im Wildstamm und in $\Delta PaAtg24$ zu vergleichbaren Effekten führt, ist es möglich, dass der Verlust von PaATG24 sich nicht auf die Adaption der Mitophagie an veränderte Bedingungen des Kulturmediums auswirkt und somit eine PaATG24-unabhängige Form der Mitophagie darstellt.

Zusammengefasst kann gezeigt werden, dass PaATG24 an der nicht-selektive Autophagie, sowie der Mitophagie beteiligt ist. Eine Mitophagieinduktion ist in $\Delta PaAtg24$ weiterhin möglich durch eine PaATG24-unabhängige Form der Mitophagie, welche sowohl während der Alterung, als auch unter Stressbedingungen beobachtet werden kann. *P. anserina* stehen somit verschiedene Signalwege zum selektiven Abbau von Mitochondrien zur Verfügung, wodurch eine dynamische Anpassung an die gegenwärtigen Nährstoff- und Umweltbedingungen möglich ist und der Verlust einer Komponente des autophagischen Abbauwegs durch adaptive Prozesse partiell kompensiert werden kann.

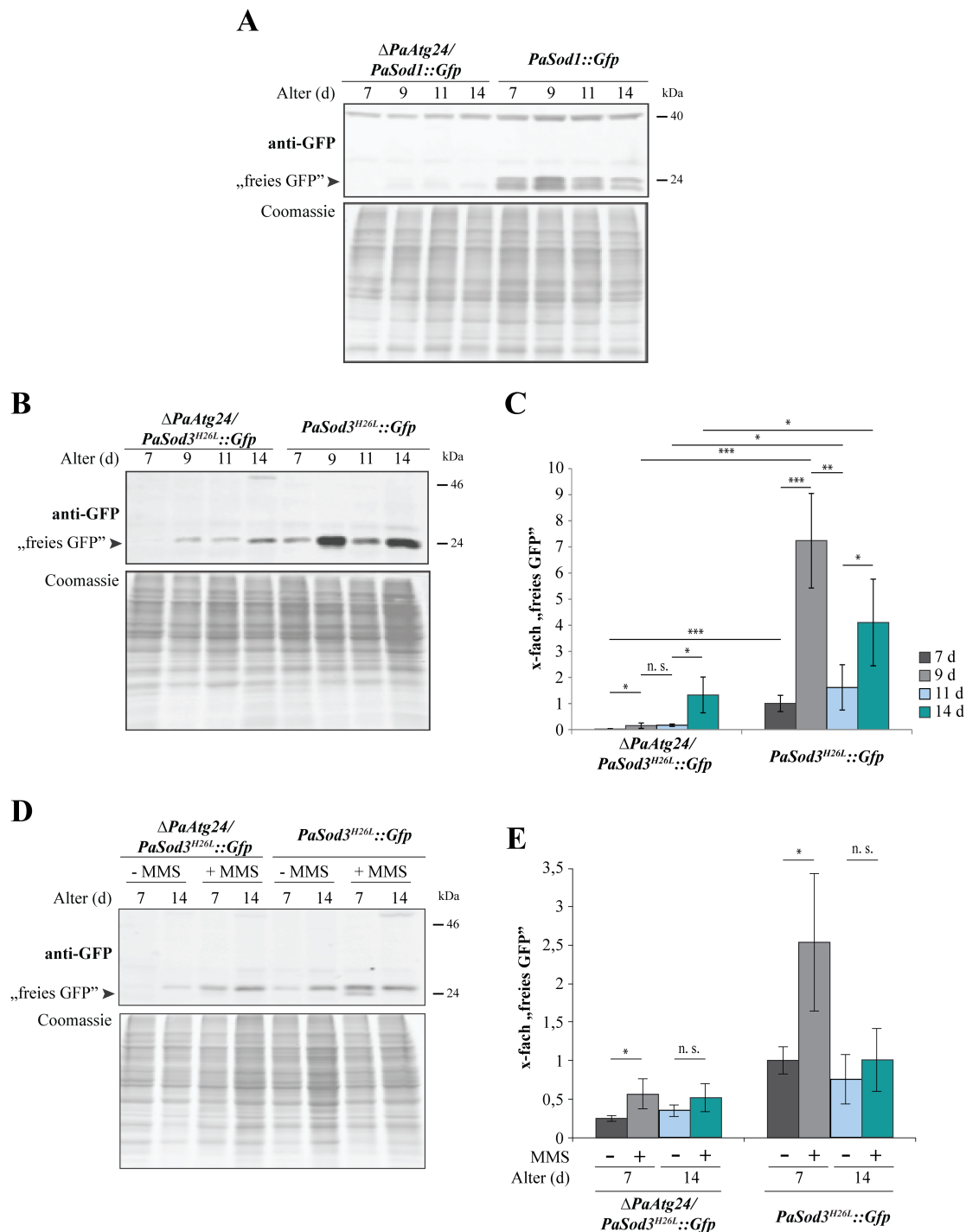


Abbildung 13: Untersuchungen zur Autophagie im *PaAtg24*-Deletionsstamm.

(A) Betrachtung der nicht-selektiven Autophagie in 7, 9, 11 und 14-Tage alten $\Delta PaAtg24/PaSod1::Gfp$ ($n=4, 4, 5, 4$) und $PaSod1::Gfp$ ($n=5, 4, 4, 4$) nach Auftrennung von je 50 μg Gesamtprotein durch eine 12 %-ige SDS-PAGE, Übertragung auf eine PVDF-Membran und Inkubation mit anti-GFP-Antikörper. (B) Western Blot-Analyse der Mitophagie in 7, 9, 11 und 14-Tage alten $\Delta PaAtg24$ und Kontrollstämmen. Es wurden je 50 μg Gesamtprotein verwendet und die Menge an „freien GFP“ mit einem anti-GFP-Antikörper analysiert. (C) Quantifizierung des „freien GFPs“ nach Verlust von PaATG24 ($n=4$, jeweils) und in $PaSod3^{H26L}::Gfp$ ($n=4, 4, 4, 3$) zur Bestimmung der Mitophagie. Der 7-Tage alte Wildstamm wurde auf 1 gesetzt und die Normalisierung der Proben erfolgte auf das Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgel. (D) Western Blot-Analyse und Quantifizierung (E) der Mitophagie mit und ohne MMS-Zugabe (0,009 %) in 7 und 14-Tage alten $\Delta PaAtg24/PaSod3^{H26L}::Gfp$ ($n=3$, jeweils) und $PaSod3^{H26L}::Gfp$ ($n=5, 4$). Es wurden jeweils 50 μg Gesamtprotein durch eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem anti-GFP-Antikörper inkubiert. Für die Quantifizierung erfolgte eine Normalisierung auf das Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgel und der 7 Tage alte Kontrollstamm ohne MMS-Zugabe wurde auf 1 gesetzt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger t -Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$). Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

3.3.2 Untersuchung der Mitochondrienfunktion und -morphologie bei Autophagiedefizienz

3.3.2.1 Bestimmung der mitochondrialen Funktion nach Verlust von Autophagie-beteiligten Proteinen

Es konnte gezeigt werden, dass PATG11 und PaATG24 an der Mitophagie von *P. anserina* beteiligt sind und der Verlust der Proteine jeweils zu einer Reduktion der Mitophagie führt. Im Folgenden soll untersucht werden, ob die geringere Mitophagierate zu Mitochondrienschäden in den *PaAtg11*- und *PaAtg24*-Deletionsmutanten führt.

Um einen Einblick zu erhalten, wie sich der Verlust der Mitophagie durch die beiden Autophagie-relevanten Proteine auf die mitochondriale Funktion auswirkt und ob diese vergleichbar ist, wurde eine Kultivierung der Stämme auf Medium mit Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle durchgeführt und die Lebensspanne und Wachsrates analysiert (Abbildung 14). Dabei stellt Glycerin eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle dar, sodass die ATP-Generierung nur durch funktionale Mitochondrien erfolgen kann (Camougrand et al. 2008). Wenn eine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion vorliegt, kann durch die Verwendung dieses Mediums keine Kompensation durch alternative Prozesse der Energieumwandlung erfolgen, was Auswirkungen auf die Lebensspanne der Stämme hat.

Die Untersuchung des *PaAtg11*-Deletionsstammes auf Glycerin-haltigem Medium zeigt, dass der Verlust von PaATG11 zu einer deutlichen Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion führt. So sinkt die maximale Lebensspanne von 19 Tage beim Wildtyp auf nur noch 6 Tage bei $\Delta PaAtg11$ (Abbildung 14 A). Die mittlere Lebensspanne des *PaAtg11*-Deletionsstammes entspricht nur noch 35 % der Wildtyp-Lebensspanne bei Kultivierung auf Glycerin-haltigem Medium (Abbildung 14 B). Die Wachsrates des Wildtyps bei Kultivierung auf Medium mit Glycerin beträgt 0,46 cm/d, der $\Delta PaAtg11$ -Stamm zeigt ein Wachstum von 0,43 cm/d was keinem signifikanten Unterschied entspricht (Abbildung 14 C).

Auch der Verlust von PaATG24 führt zu einer verkürzten Lebensspanne (Abbildung 14 D). Dabei reduziert sich die maximale Lebensspanne von 19 Tagen beim Wildtyp auf 11 Tage bei der Mutante. Die Reduktion der Lebensspanne zeigt sich auch bei der mittleren Lebensspanne. Im Mittel lebt $\Delta PaAtg24$ nur halb so lang, wie der Wildtyp, wenn eine Kultivierung auf

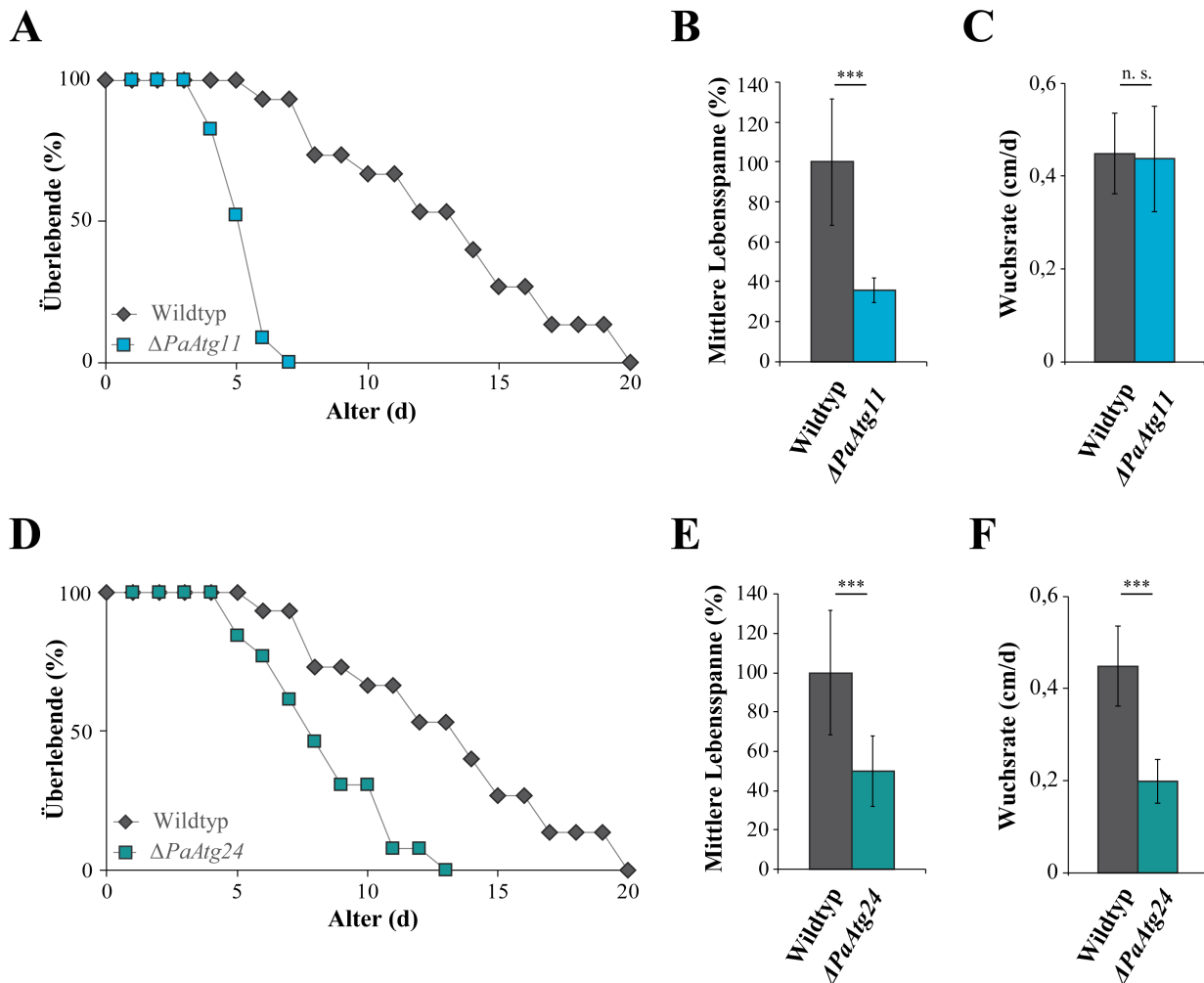


Abbildung 14: Analyse der Lebensspanne von Wildtyp, $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg24$ bei Kultivierung auf M2-Medium mit Glycerin.

(A) Bestimmung der Lebensspanne, der mittleren Lebensspanne (B) und der Wachstumsrate (C) nach Verlust von PaATG11 ($n=23$) und dem Wildstamm ($n=15$) bei 27 °C und Dauerlicht auf M2-Medium mit Glycerin. (D) Lebensspanne, mittlere Lebensspanne (E) und Wachstumsrate (F) von $\Delta PaAtg24$ ($n=13$) und Wildtyp ($n=15$) auf M2-Medium mit Glycerin. Zur Analyse der mittleren Lebensspanne wurde der Wildtyp auf 100 % gesetzt und die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen t -Test durchgeführt ($n. s.$ = nicht signifikant; *** = $p \leq 0,001$). Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

Glycerin-haltigem Medium erfolgt (Abbildung 14 E). Bei $\Delta PaAtg24$ kann ein zum Wildtyp deutlich verlangsamtes Wachstum von 0,2 cm/d beobachtet werden (Abbildung 14 F).

Sowohl $\Delta PaAtg11$, als auch $\Delta PaAtg24$, zeigen eine beeinträchtigte Lebensspanne durch die Kultivierung auf Glycerin-haltigem Medium, wodurch angenommen werden kann, dass eine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion in beiden Stämmen vorliegt, welche bei $\Delta PaAtg11$ unter Normalbedingungen nicht erkennbar ist. In $\Delta PaAtg24$ kommt es zusätzlich zur Lebensspannenverkürzung zu einer Verlangsamung der Wachstumsrate, was in $\Delta PaAtg11$ nicht der Fall ist. Es handelt sich somit um unterschiedliche Prozesse, welche die Lebensspanne und Wachstumsrate in den beiden Stämmen beeinflussen.

3.3.2.2 Betrachtung der Mitochondrienmorphologie in Autophagiemutanten

Aufgrund der verkürzten Lebensspannen von $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg24$ auf Glycerin-haltigem Medium kann von einer beeinträchtigten Mitochondrienfunktion ausgegangen werden. Eine Untersuchung der Mitochondrienmorphologie in $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg24$ soll im Folgenden Aufschluss darüber geben, ob die Einschränkungen der mitochondrialen Funktion in Zusammenhang mit der Morphologie gebracht werden können. Diese Analyse kann ebenfalls zeigen, ob die unterschiedlichen Wuchsraten der beiden Stämme von der Mitochondrienmorphologie beeinflusst sind.

Hierzu wurden die Stämme nach Isolation und Keimung der Sporen auf M2-Medium kultiviert und einen Tag vor der mikroskopischen Analyse auf Muldenobjektträger mit M2-Medium überführt. Anschließend erfolgte die Visualisierung der Mitochondrien durch das GFP-gekoppelte mitochondrial lokalisierte Reporterprotein PaSOD3^{H26L}::GFP mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 15).

Wie bei Scheckhuber et al. (2007) beschrieben, zeigt der Wildstamm im juvenilen Alter (7 d) filamentöse Mitochondrien und während der Alterung kommt es zu einer Umstrukturierung, sodass im seneszenten Stadium (21 d) hauptsächlich fragmentierte Mitochondrien vorliegen (Abbildung 15). In der *PaAtg24*-Deletionsmutante sind bei 7 und 14 Tage alten Stämmen nur geringe Unterschiede in der Morphologie und Menge der Mitochondrien im Vergleich zum Kontrollstamm vorhanden (Abbildung 15, S2). Aufgrund der verkürzten Lebensspanne der *PaAtg24*-Deletionsmutante auf Normalmedium ist es nicht möglich ein späteres Altersstadium zu untersuchen. Der nahezu vollständige Verlust der Mitophagie in $\Delta PaAtg24$ hat somit keine erkennbaren Auswirkungen auf die mitochondriale Morphologie und auch eine Analyse der Menge der mitochondrialen Proteine zeigt, dass keine Akkumulation von Mitochondrien durch den Verlust von PaATG24 vorliegt (Abbildung S2).

Im Gegensatz dazu zeigt sich in $\Delta PaAtg11$ ein eindeutiger Effekt der *PaAtg11*-Deletion. Durch den Verlust von PaATG11 sind in juvenilen Stämmen nahezu nur fragmentierte und punktförmige Mitochondrien vorhanden, wodurch ein deutlicher Unterschied zum gleichaltrigen Kontrollstamm erkennbar ist (Abbildung S3). Während der Alterung der *PaAtg11*-Deletionsmutante kommt es zu einer Veränderung der Mitochondrien, sodass im mittelalten Stadium (14 d) hauptsächlich filamentöse Mitochondrien vorliegen, bevor es

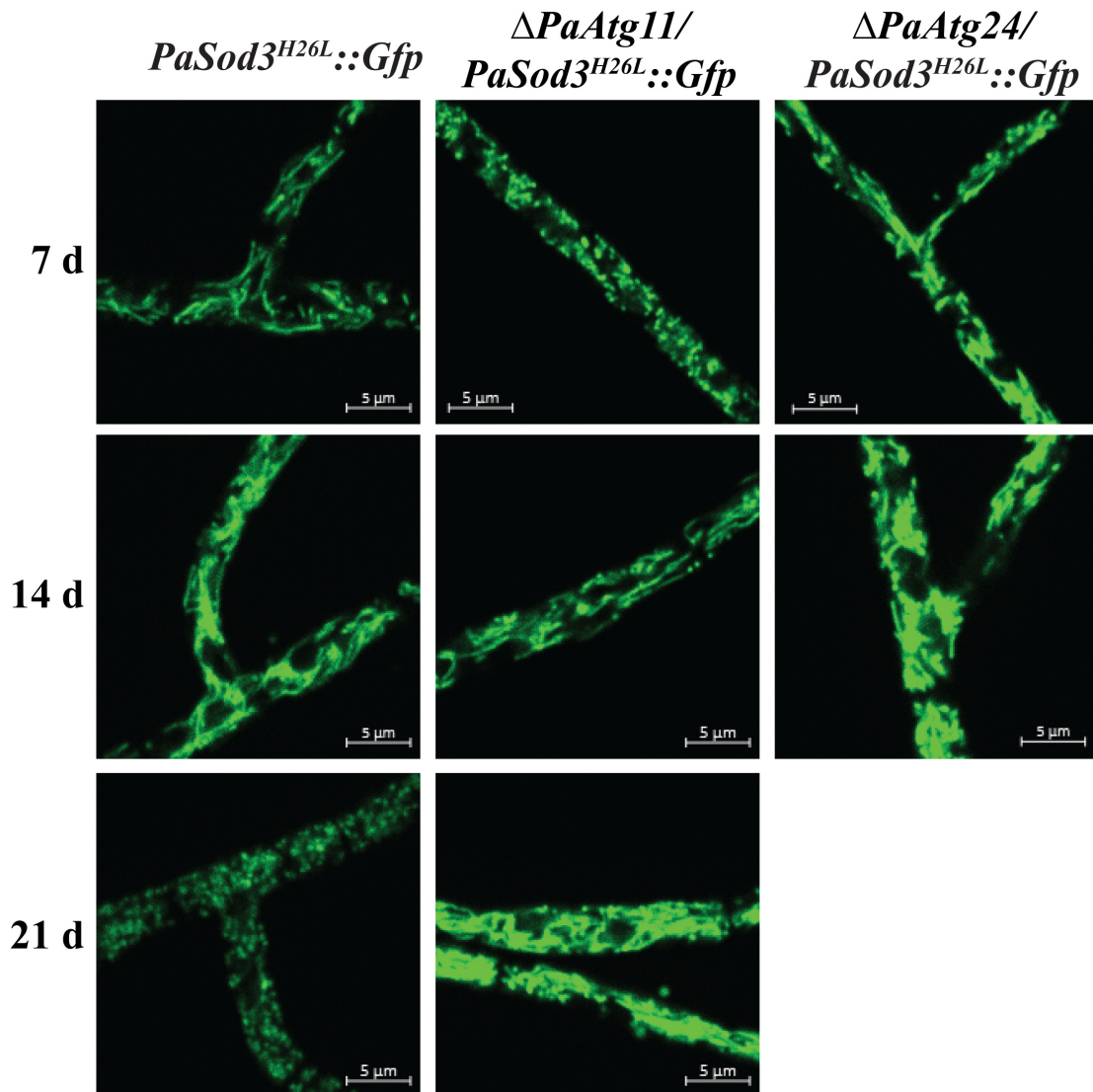


Abbildung 15: Effekt des Verlusts von PaATG11 und PaATG24 auf die Mitochondrienmorphologie.

Mikroskopische Analyse der Mitochondrien durch das mitochondrial lokalisierte Reporterprotein PaSOD3^{H26L}::GFP in $\Delta PaAtg11$, $\Delta PaAtg24$ und im Kontrollstamm in 7, 14 und 21 Tage alten Stämmen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von je n=3, beziehungsweise n=6 bei 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg11$. Der Maßstab entspricht 5 μm , die Belichtungszeit bei allen Aufnahmen ist 0,7 ms. Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

aufgrund der Alterung wieder zu einer stärkeren Fragmentierung und einer Anreicherung von Mitochondrien kommt. Aufgrund dieses unerwarteten Phänomens wurde das Experiment wiederholt, um die Stichprobenzahl zu erhöhen. Dabei wurde der gleiche Befund festgestellt. Weitere Abbildungen zu der Veränderung der Mitochondrien des 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg11$ -Stamms sind im Anhang zu finden (Abbildung S3). Somit ist PaATG11 als Gerüstprotein in juvenilen *P. anserina*-Stämmen ein relevantes Protein für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie und möglicherweise damit einhergehend der Funktion der Mitochondrien.

Um zu untersuchen, ob die verkürzte Lebensspanne auf Glycerin-haltigem Medium auf die Mitochondrienmorphologie zurückzuführen ist, wurden unterschiedliche Altersstadien von $\Delta PaAtg11$ auf diesem Medium kultiviert. Zunächst erfolgte die übliche Isolation und Kultivierung von $\Delta PaAtg11$ -Stämmen und Wildtypstämmen auf M2-Medium. Dies geschah bis zu einem Alter von 7 bzw. 14 Tagen, bevor die Stämme auf M2-Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle übertragen wurden. Hierdurch konnte die Alters-abhängige mitochondriale Funktion der 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg11$ -Stämme untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Bei der Untersuchung der mitochondrialen Funktion von 7 Tage alten $PaAtg11$ - und Wildtypstämmen zeigt sich, dass die Lebensspanne der Deletionsmutante weiterhin stark verkürzt ist. Wenn $\Delta PaAtg11$ nach 7 Tagen auf M2-Medium auf Glycerin-haltiges Medium umgesetzt wird, lebt der Stamm maximal weitere 7 Tage, während der Wildtyp in der Lage ist weitere 14 Tage zu leben (Abbildung 16 A). Die relative mittleren Lebensspanne ist bei $\Delta PaAtg11$ um 40 % im Vergleich zum Wildtyp verkürzt (Abbildung 16 B). Nachdem $\Delta PaAtg11$ für 7 Tage auf M2-Medium kultiviert wurde, zeigt der Stamm auf M2-Medium mit Glycerin eine mittlere Lebensdauer von 3 Tagen auf dem Glycerin-Medium, während der Wildstamm 10 Tage überlebt. Die Kultivierung der Stämme auf M2-Medium bis zu einem Alter von 14 Tagen und anschließender Inkubation auf Glycerin-haltigem Medium führt hingegen dazu, dass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Wildtyp und $PaAtg11$ -Deletionsmutante festgestellt werden kann (Abbildung 16 C, D).

Die Befunde zeigen somit, dass die Veränderung der Mitochondrienmorphologie während der Alterung von $\Delta PaAtg11$ dazu führt, dass die Lebensspanne auf Glycerin-haltigem Medium sich wieder dem Wildtyp angleicht und somit die Mitochondrienfunktion verbessert ist. Die Mitochondrien in 7 Tage alten $\Delta PaAtg11$ zeigen somit eine schlechtere mitochondriale Funktion als die Mitochondrien in den 14 Tage alten Deletionsstämmen.

3.3.2.3 Auswirkung des Verlustes von PaATG11 und PaATG24 auf die Mitochondrien

Bei der Untersuchung der Mitochondrien des $PaAtg11$ -Deletionsstammes konnte festgestellt werden, dass diese im juvenilen Stadium stark fragmentiert vorliegen und diese Fragmentierung

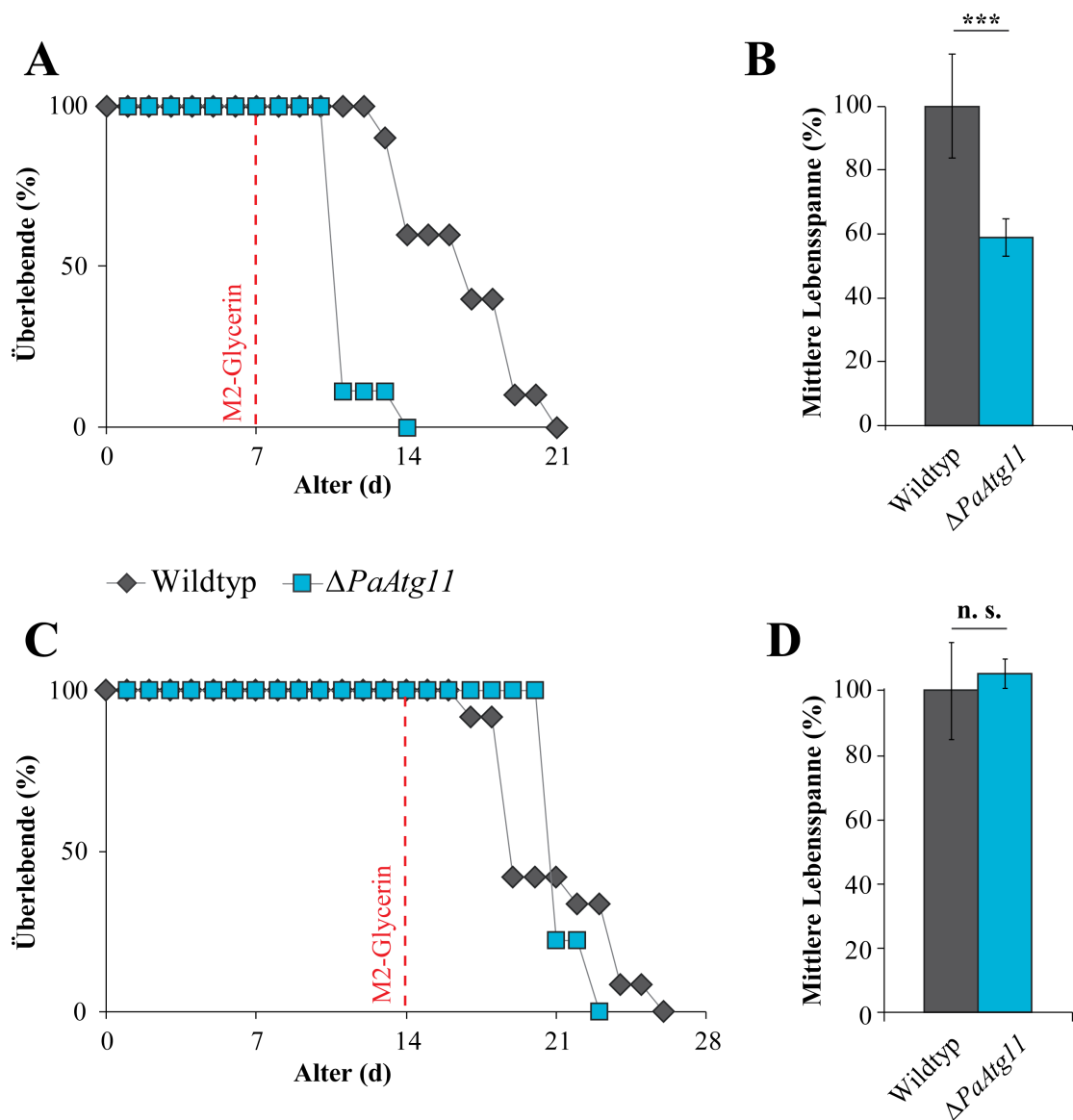


Abbildung 16: Einfluss der Mitochondrienmorphologie auf die Mitochondrienfunktion in $\Delta PaAtg11$.

Betrachtung der Lebensspanne und mittlere Lebensspanne des Wildtyps ($n=10, 12$) und des *PaAtg11*-Deletionsstammes ($n=9, 9$) bei altersabhängiger Kultivierung auf M2-Medium mit Glycerin. Nach 2 Tagen Keimung auf BMM-Medium mit Ammoniumacetat erfolgte die Anzucht der Stämme auf M2-Medium (27 °C, Dauerlicht), bevor sie in einem Alter von 7 (**A, B**), bzw. 14 Tagen (**C, D**) auf M2-Medium mit Glycerin überführt und inkubiert wurden (rote Linie). Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger *t*-Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; *** = $p \leq 0,001$).

möglicherweise zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien führen. Dieser Befund zeigt eine wichtige Funktion von PaATG11 im Bereich der Mitochondrien in juvenilen *P. anserina*-Stämmen, welche auch in anderen Organismen in dieser Form noch nicht beschrieben wurde. In $\Delta PaAtg24$ liegt hingegen keine Veränderungen der Mitochondrienmorphologie vor, dennoch kann eine stark verringerte Mitophagierate festgestellt werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der zusätzliche Verlust eines Autophagie-Proteins den Phänotyp von $\Delta PaAtg24$ weiter beeinträchtigt und somit durch einen additiven Effekt geschlussfolgert werden

kann, ob PaATG11 und PaATG24 in unterschiedliche Prozesse der Autophagie involviert sind. Die Befunde von $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg24$ zeigen, dass PaATG11 und PaATG24 eine Funktion in der Mitophagie von *P. anserina* besitzen und die Mitochondrienfunktion in beiden Deletionsstämmen beeinträchtigt ist. Während die Mitochondrien in $\Delta PaAtg24$ keine Veränderung der Mitochondrienmorphologie aufweist, sind die Mitochondrien in juvenilen $\Delta PaAtg11$ -Stämmen stark fragmentiert. Um einen tieferen Einblick zu erhalten, ob sich die Funktion dieser beiden Proteine überschneidet, erfolgte die Erstellung einer Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ durch Kreuzung der beiden Deletionsstämme. Die Verifizierung der Doppeldelation erfolgte durch eine Southern Blot-Analyse (Abbildung S1 H).

Bei der Untersuchung von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ zeigte sich, dass dieser Stamm Fertilitäts- und Keimungsprobleme aufweist, indem nur wenige Sporen gebildet werden (nicht dargestellt). Daher konnten zu wenige biologische Replikate für eine Lebensspannenanalyse isoliert werden und es wurden, ausgehend von drei biologischen Replikaten, jeweils 4-5 technische Replikate erstellt, um einen initialen Eindruck dieser Doppelmutante zu erhalten. Die Ergebnisse dieser initialen Charakterisierung von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ sind in Abbildung 17 dargestellt.

Der Verlust von PaATG11 und PaATG24 führt zu einem sehr hell pigmentierten Myzel mit fast vollständigem Fehlen des Luftmyzels in der Doppelmutante (Abbildung 17 A). Die Wachsrate ist in $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ (gelb) im Vergleich zum Wildtyp (grau) deutlich verringert und entspricht nur 0,4 cm/d. Die Doppelmutante zeigt keinen signifikanten Unterschied zu der Wachsrate des *PaAtg24*-Deletionsstammes (petrol) (Abbildung 17 B).

Die maximale Lebensspanne der Doppelmutante (gelb) ist deutlich verkürzt im Vergleich zu den drei anderen betrachteten Stämmen (Abbildung 17 C). Da es sich hier um initiale Experimente handelt, ist diese Analyse unter Vorbehalt zu betrachten, dennoch kann eine Tendenz durch die vorliegenden Experimente abgeleitet werden. Bei der mittleren Lebensspanne zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Rückgang bei der Doppelmutante, im Vergleich zum Wildtyp kommt es zu einer Halbierung der Lebensspanne (Abbildung 17 D). $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ (gelb) stirbt im Mittel 10 Tage vor dem Wildtyp (grau) und $\Delta PaAtg11$ (hellblau), sowie 6 Tage vor der *PaAtg24*-Deletionsmutante (petrol).

Insgesamt zeigt sich, dass $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ einen stark veränderten Phänotyp aufweist und die Lebensspanne und Wachsrate deutlich beeinträchtigt ist. Da die Doppeldelation stärker

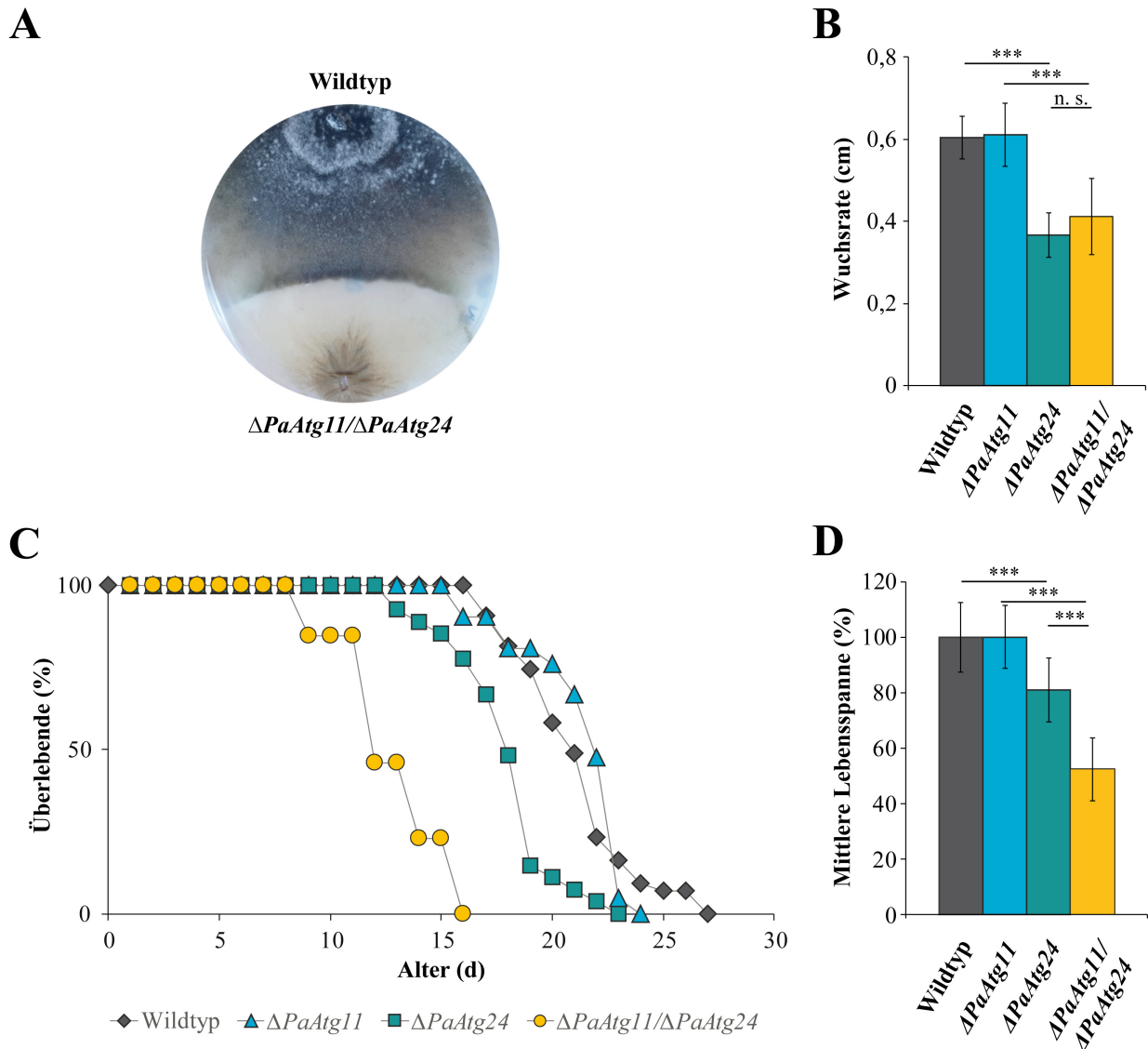


Abbildung 17: Charakterisierung der Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$.

(A) Phänotyp des Wildstammes im Vergleich zur Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ nach 10 Tagen Wachstum auf M2-Medium. (B) Bestimmung der Wuchsrate, der Lebensspanne (C), sowie der mittleren Lebensspanne (D) des Wildtyps (n=43, grau), $\Delta PaAtg11$ (n=21, hellblau), $\Delta PaAtg24$ (n=27, petrol) und $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ (gelb) mit n=3, mit insgesamt 13 technischen Replikaten, auf M2-Medium zum Vergleich der Doppelmutante zu den einzelnen, vorher bereits charakterisierten Stämmen. Die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test (n. s. = nicht signifikant; *** = $p \leq 0,001$).

betroffen ist als die jeweiligen Einzeldelentionsstämme, kann von einem, zumindest partiell, additiven Effekt ausgegangen werden. Somit bestätigt sich, dass beiden Proteine teilweise in unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind.

Um einen tieferen Einblick in den Zusammenhang der Mitochondrienfunktion von $\Delta PaAtg11$ und $PaAtg24$ zu erhalten, wurde mit der Doppeldeletion ebenfalls die Funktion der Mitochondrien mit Hilfe des Glycerin-haltigem Mediums analysiert. Die Ergebnisse dieser

Untersuchung sind in (Abbildung 18) dargestellt.

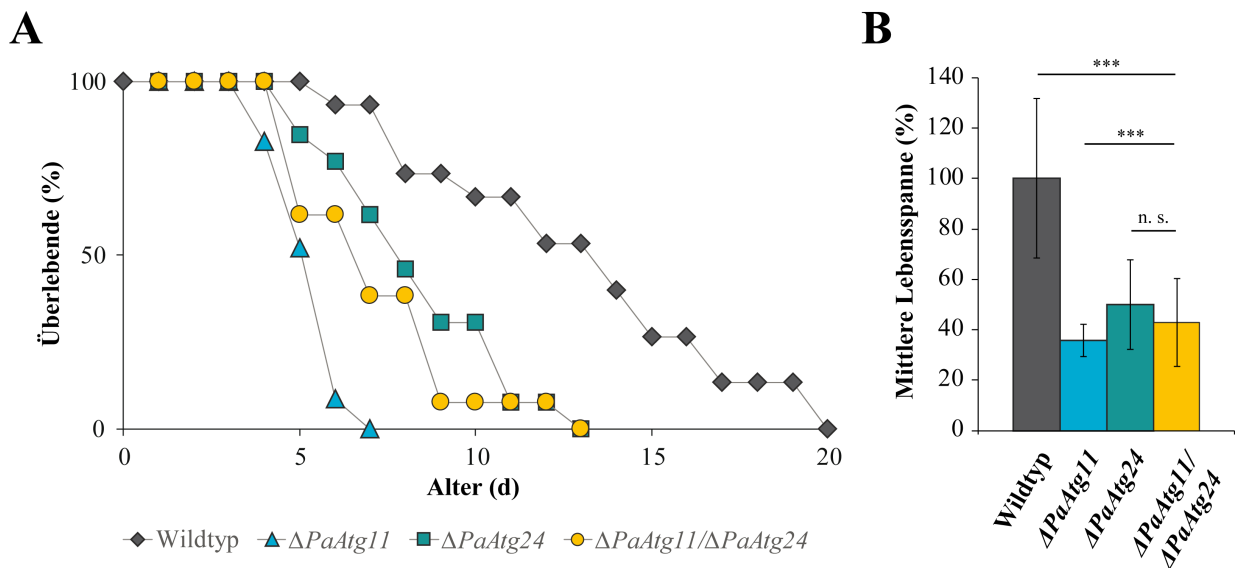


Abbildung 18: Analyse der Mitochondrienfunktion von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ durch Kultivierung auf Glycerin-Medium.

A Darstellung der Lebensspanne und der mittleren Lebensspanne (**B**) des Wildtyps (n=15, grau), $\Delta PaAtg11$ (n=23, hellblau), $\Delta PaAtg24$ (n=13, petrol) und $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ (gelb) mit n=13 von 3 biologischen Replikation auf M2-Medium mit Glycerin. Die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test (n. s. = nicht signifikant; *** = $p \leq 0,001$).

Die Untersuchung der maximalen Lebensspannen auf Glycerin-haltigem Medium zeigt, wie bereits zuvor beschrieben, eine starke Verkürzung der Lebensspanne von $\Delta PaAtg11$ (hellblau) im Vergleich zum Wildtyp (grau) (Abbildung 18 A). Die Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ (gelb) hingegen zeigt eine im Vergleich zu $\Delta PaAtg11$ (hellblau) verlängerte Lebensspanne, welche vergleichbar zum $\Delta PaAtg24$ -Deletionsstamm (petrol) ist. Bei der mittleren Lebensspanne kann ebenfalls dieser Effekt beobachtet werden. Die Lebensspanne von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ (gelb) ist um 57 % zum Wildtyp (grau) reduziert und liegt genau zwischen $\Delta PaAtg11$ (hellblau) und $\Delta PaAtg24$ (petrol). Der zusätzliche Verlust von PaATG24 in $\Delta PaAtg11$ (gelb) führt zu einer mittleren Lebensverlängerung von 17 % im Vergleich zu $\Delta PaAtg11$ (hellblau). Diese Ergebnisse sind aufgrund der verwendeten technischen Replikate als initial anzusehen, zeigen allerdings eine Tendenz, dass die Mitochondrienfunktion in der Doppelmutante besser ist als im $\Delta PaAtg11$ -Deletionsstamm, gemessen durch die Kultivierung auf Glycerin-haltigem Medium.

Um festzustellen, ob die Mitochondrien von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ den Wildtyp-ähnlichen Mitochondrien von $\Delta PaAtg24$ entsprechen, oder eine vergleichbare Mitochondrienfragmentierung bei 7 Tage alten Stämmen wie bei $\Delta PaAtg11$ vorliegt, wurden

die Mitochondrien mikroskopiert. Dazu wurde eine konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit 7 Tage alten Wildtypstämmen, $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ durchgeführt (Abbildung 19). Die Kultivierung erfolgte nach Alterung auf M2-Agarplatten für einen Tag vor Mikroskopie auf Muldenobjektträgern mit M2-Medium. Die Färbung der Mitochondrien wurde mit 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ MitoTrackerRed in H_2O durchgeführt.

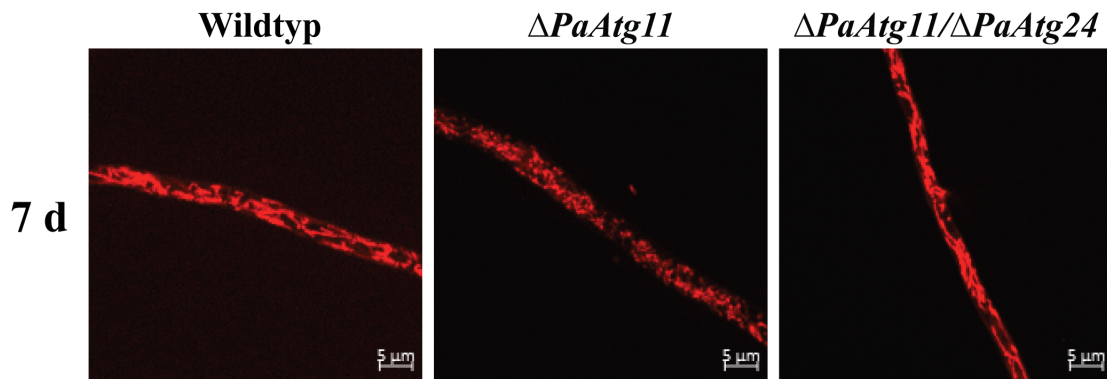


Abbildung 19: Die Fragmentierung juveniler Mitochondrien in $\Delta PaAtg11$ ist PaATG24-abhängig.

Untersuchung von MitoTrackerRed in H_2O (2 $\mu\text{M}/\text{ml}$) gefärbten Mitochondrien mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop in 7 Tage alten Wildtyp, $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$. Dargestellt sind repräsentative Bilder von jeweils $n=3$ untersuchten Stämmen. Der Maßstab entspricht 5 μm .

Wie bereits zuvor festgestellt, zeigen die Mitochondrien des Wildtyps die typische filamentöse Morphologie, während die Mitochondrien der *PaAtg11*-Deletionsmutante bei 7 Tage alten Stämmen stark fragmentiert vorliegen (Abbildung 19). Die Mitochondrien der Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ sind filamentös und entsprechen den Mitochondrien des Wildtyps. Somit spiegeln die Mitochondrien die Befunde zur Mitochondrienfunktion der Doppelmutante und $\Delta PaAtg11$ wider, gemessen durch die Kultivierung auf Glycerin-haltigem Medium. Während in der *PaAtg11*-Deletionsmutante die Mitochondrienfunktion in juvenilen Stämmen stark beeinträchtigt ist und die Mitochondrien fragmentiert vorliegen, ist die Funktion der Mitochondrien in der Doppelmutante weniger stark beeinträchtigt (da die Lebensspanne auf Glycerin-haltigem Medium im Vergleich zu $\Delta PaAtg11$ verlängert ist) und die Mitochondrien zeigen nicht die juvenile Fragmentierung. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ein Zusammenhang in $\Delta PaAtg11$ zwischen der Mitochondrienfunktion und den fragmentierten Mitochondrien besteht.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zu den Mitochondrien in $\Delta PaAtg11$, $\Delta PaAtg24$

und $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$, dass die Mitophagie, die Mitochondrienfunktion und die Mitochondrienmorphologie eng miteinander verknüpft sind. Die beobachteten Effekte sind jeweils in Abhängigkeit der jeweiligen Altersstadien aufgetreten und auch in vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Autophagie in *P. anserina* Alters-abhängig ist.

Wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt ist PaATG24 wichtig für die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie in *P. anserina*. Jedoch scheint PaATG24 kein spezifisches Protein der selektiven Autophagie zu sein, sondern ist ebenso an der nicht-selektiven Autophagie beteiligt. Eine Untersuchung der PaATG24-abhängigen Prozesse und der Einflüsse auf die PaATG24-Proteinmenge kann weiteren Aufschluss über die Funktion dieses sortierenden Nexins in *P. anserina* liefern.

3.3.3 Analyse zum Einfluss von Alterungsprozessen und Autophagie auf die PaATG24-Menge

Während der Alterung von *P. anserina* sind statistisch signifikant mehr Autophagie-Gene hochreguliert, bei einer gleichzeitigen Reduktion der Geneexpression von Genen, welche für Proteinen des Proteasoms kodieren, wie eine zuvor durchgeführte Transkriptomanalyse bei verschiedenen Altersstadien zeigte (Philipp et al. 2013). In Abschnitt 3.3.1 wurde dargestellt, dass die Mitophagie in $\Delta PaAtg24$ stark beeinträchtigt ist und nur in alten Stämmen und bei einer Mitophagieinduktion kam es zu einer Erhöhung der Mitophagierate. Somit kann angenommen werden, dass PaATG24 vor allem im juvenilen Alter des Wildtyps für die Aufrechterhaltung der Mitophagie benötigt wird. Um einen genaueren Eindruck von PaATG24 während der Alterung zu erhalten, wurde die Proteinmenge von PaATG24 im Wildtyp in 7, 14 und 21 Tage alten Stämmen mit einem anti-PaATG24-Antikörper in einer Western Blot-Analyse bestimmt. Dazu wurde Gesamtprotein von 7, 14 und 21 Tage alten Wildtypstämmen isoliert und in einer Western Blot-Analyse mit einem anti-PaATG24 Antikörper analysiert (Abbildung 20).

Während der Alterung von *P. anserina* steigt die Menge von PaATG24 vom juvenilen Alter (7 d) zum mittelalten Stadium (14 d) leicht an, jedoch nicht signifikant (Abbildung 20) Im weiteren Verlauf der Alterung kommt es von 14 Tagen zu 21 Tagen zu einer Verringerung der

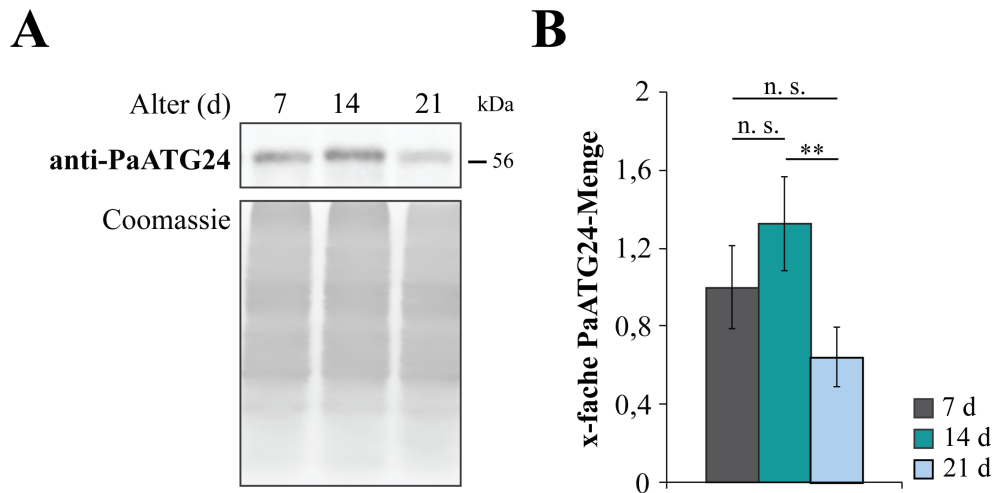


Abbildung 20: PaATG24 während der Alterung von *P. anserina*.

(A) Western Blot-Analyse nach Auftrennung von je 50 µg Gesamtprotein von 7, 14 und 21 Tage alten Wildstamm-Proben mit einer 12 %-igen SDS-PAGE und anschließender Behandlung mit anti-PaATG24-Antikörper. (B) Die Quantifizierung von PaATG24 aus 7, 14 und 21 Tage alten Wildstamm-Proben (n= 4, 4, 3) nach Normalisierung auf das Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgel. Der Wildstamm wurde auf 1 gesetzt und die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen *t*-Test (n. s. = nicht signifikant; ** = $p \leq 0,01$).

PaATG24-Menge um 50 %, sodass im seneszenten Wildstamm nur noch halb so viel PaATG24 wie im mittelalten Stadium vorliegt. Somit lässt sich feststellen, dass PaATG24 vor allem in jungen und mittelalten Stämmen benötigt wird und dieses sortierende Nexin in der letzten Lebensphase dieses Modellorganismus nur noch eine verringerte Proteinmenge vorliegt.

Da gezeigt werden konnte, dass in $\Delta PaAtg24$ eine Mitophagieinduktion möglich ist, aber die nicht-selektive Autophagie und basale Mitophagie in dem Deletionsstamm beeinträchtigt sind, soll im nächsten Schritt untersucht werden, inwiefern sich der Verlust von Autophagie-assoziierten Proteinen auf die PaATG24-Menge auswirkt (Abbildung 21 A-D).

Die Proteinmenge von PaATG24 in der *PaAtg8*-Deletionsmutante ist in 7 Tage alten Stämmen reduziert im Vergleich zum gleichaltrigen Wildtyp (Abbildung 21 A). Die Quantifizierung zeigt, dass statistisch signifikant weniger PaATG24 vorhanden ist, wie in Abbildung 21 B zu erkennen ist, dabei handelt es sich um 31 % geringere Proteinmenge. Während der Alterung steigt PaATG24 in $\Delta PaAtg8$ signifikant an, sodass es von 7 auf 14 Tage alten Stämmen zu einer Verdopplung der PaATG24-Menge kommt. Im Vergleich zum Wildtyp, liegt in den 14 Tage alten $\Delta PaAtg8$ -Stamm signifikant mehr PaATG24 vor. Aufgrund der verkürzten Lebensspanne der *PaAtg8*-Deletionsmutante war es nicht möglich ein älteres Stadium zu

untersuchen. Insgesamt zeigt sich, dass der Verlust von PaATG8 zu einer Veränderung der PaATG24-Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp führt, wobei die Menge in $\Delta PaAtg8$ Alters-abhängig ist.

Im Vergleich dazu zeigt die Deletion von *PaAtg11* keine solchen Auswirkungen auf die PaATG24-Proteinmenge (Abbildung 21 C, D). Bei $\Delta PaAtg11$ entspricht die PaATG24-Menge in allen untersuchten Altersstadien der des Wildtyps.

Bei den betrachteten Stämmen $\Delta PaAtg8$ und $\Delta PaAtg11$ handelt es sich um Autophagie-defiziente Mutanten. Um untersuchen zu können, inwiefern sich die PaATG24-Proteinmenge im Fall einer Autophagie-Induktion verhält, erfolgte eine Untersuchung bei Stickstoffmangelbedingungen.

Die Kultivierung von Stämmen unter Stickstoffmangel ist ein übliches Verfahren, um die nicht-selektive Autophagie zu induzieren. Die Untersuchung von PaATG24 in CM-N \downarrow -Medium, bei welchem Harnstoff als Stickstoffquelle fehlt, zeigt, dass diese Mangelbedingungen zu einer Erhöhung der PaATG24-Proteinkonzentration im Wildtyp führt (Abbildung 21 E, F). Dabei kommt es beim 7 Tage alten Wildtyp aufgrund des Stickstoffmangels zu einer 1,6-fachen PaATG24-Menge und bei 14 Tage alten Stämmen kann in CM-N \downarrow -Medium eine 1,3-fache Proteinmenge im Vergleich zum Normalmedium bei dem gleichaltrigen Wildstamm festgestellt werden. Dies zeigt, dass durch eine Autophagieinduktion eine Erhöhung der PaATG24-Proteinmenge möglich ist und bei Stickstoffmangel mehr PaATG24 vorliegt.

Zusammengefasst zeigt die Untersuchung der PaATG24-Proteinmenge, dass bei dem Verlust von PaATG8 signifikant und Alters-abhängig eine Erhöhung der PaATG24-Menge im Vergleich zum Wildtyp vorliegt, während der Verlust von PaATG11 keine Auswirkung zeigt. Die Kultivierung des *P. anserina* Wildtyps auf Stickstoffmangelmedium wiederum führt auch zu einer Erhöhung der PaATG24-Menge. Die Aktivierung und der Verlust der nicht-selektiven Autophagie führt somit jeweils zu einem Anstieg der PaATG24-Proteinmenge.

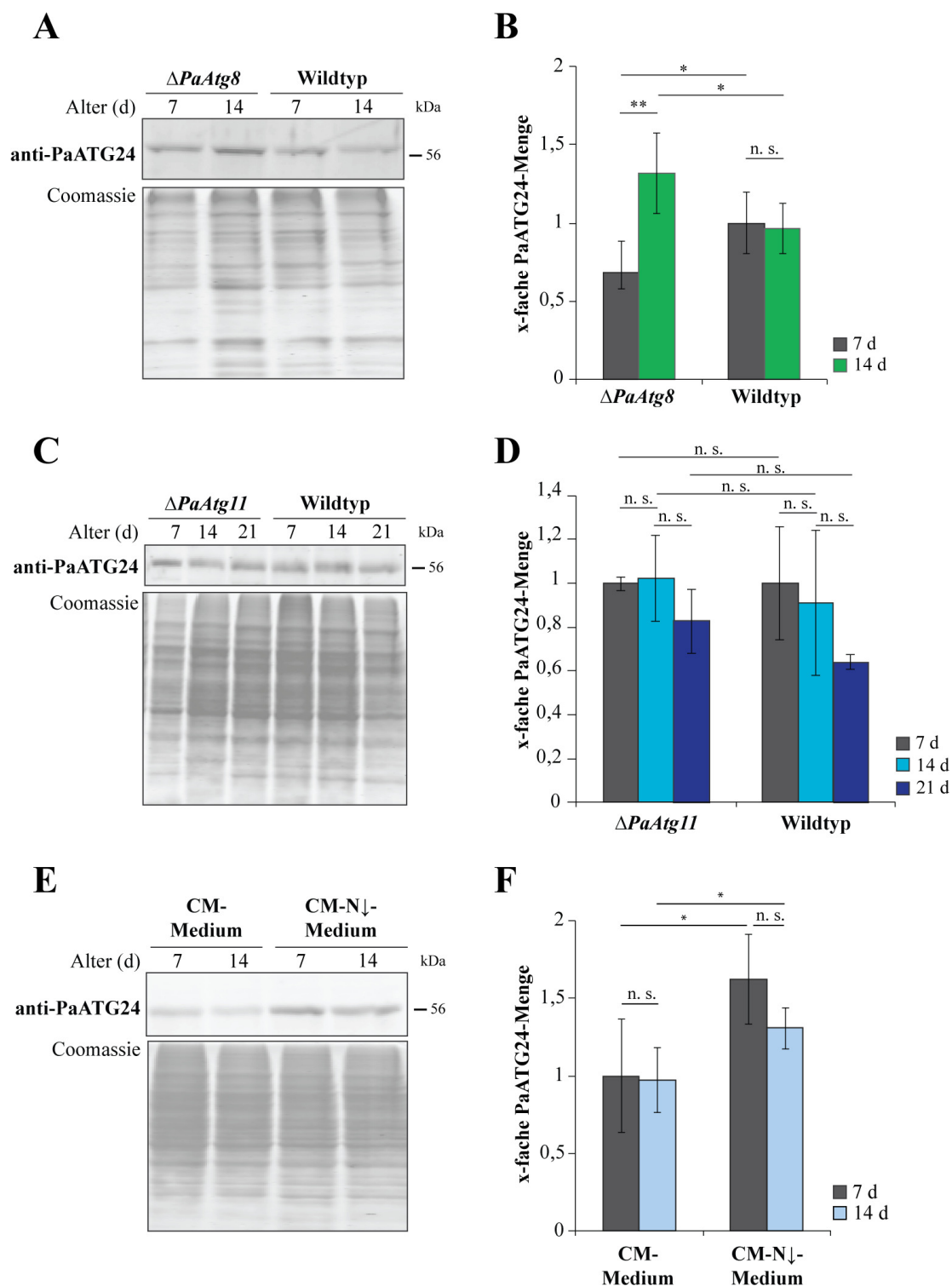


Abbildung 21: PaATG24-Proteinmenge bei Beeinträchtigung bzw. Induktion der Autophagie.

(A, B) Untersuchung und Quantifizierung von PaATG24 in 7 und 14 Tage alten Wildtyp ($n=5$, jeweils) und $\Delta PaAtg8$ ($n=5, 4$). (C, D) Western Blot-Analyse von Wildtyp ($n=5, 4, 3$) und $\Delta PaAtg11$ ($n=5, 4, 2$) zur Bestimmung von PaATG24 in 7, 14 und 21 Tage alten Stämmen und anschließende Quantifizierung. (E, F) Western Blot-Analyse und Quantifizierung von PaATG24 in 7 und 14 Tage alten Wildtypstämmen nach Kultivierung in CM-Medium ($n=5, 4$) oder CM-N↓-Medium ($n=5$, jeweils), welches kein Harnstoff als Stickstoffquelle enthält. Die Quantifizierungen erfolgten nach Normalisierung auf das jeweilige 12 %-ige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel und der 7 Tage alte Wildstamm (CM-Medium) wurde auf 1 gesetzt. Verwendet wurden bei allen Stämmen 50 μ g Gesamtprotein. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger t -Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$).

3.3.4 Untersuchung der Autophagosomen in $\Delta PaAtg24$

PaATG24 wird, wie in Abbildung 13 dargestellt, für den Prozess der nicht-selektiven und selektiven Autophagie benötigt und auch eine Autophagieinduktion führt zu einem Anstieg der PaATG24-Proteinmenge. Um die Funktion von PaATG24 im Bereich der Autophagie zu untersuchen, wurde im Folgenden der Prozess der Autophagosomenbildung näher betrachtet. Wie zuvor beschrieben, ist PaATG8 ein zentrales Protein der Autophagosomenbildung. Um untersuchen zu können, ob der Verlust von PaATG24 einen Einfluss auf PaATG8 hat, wurde zunächst die Transkript- und Proteinmenge von PaATG8 im *PaAtg24*-Deletionsstamm untersucht (Abbildung 22).

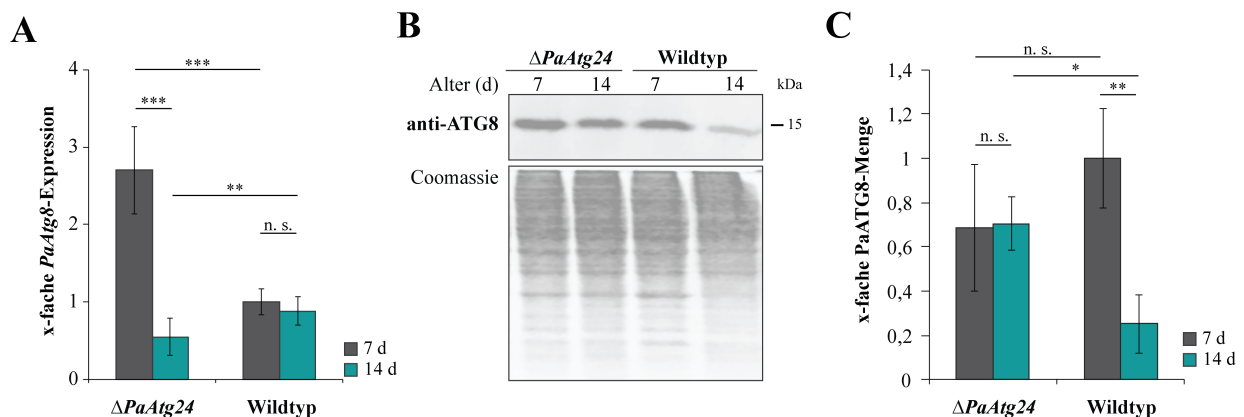


Abbildung 22: Betrachtung der *PaAtg8*-Expression und PaATG8-Proteinmenge nach Verlust von PaATG24.

(A) Quantifizierung der *PaAtg8*-Menge nach RT-PCR aus RNA-Proben von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24$ ($n=3$) und Wildtypstämmen ($n=3$). Die Normierung erfolgte auf PaPorin und der 7 Tage alte Wildstamm wurde auf 1 gesetzt. **(B, C)** Western Blot-Analyse mit anti-PaATG8-Antikörper und Quantifizierung von 50 μ g Gesamtprotein aus 7 und 14 Tage alten *PaAtg24*-Deletionsstämmen ($n=4, 3$) und Wildtypstämmen ($n=4, 3$). Die Normalisierung erfolgte auf das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel und der 7 Tage alte Wildstamm wurde auf 1 gesetzt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger *t*-Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

Die Analyse der *PaAtg8*-Expression zeigt, dass im Wildstamm keine signifikante Änderung zwischen 7 und 14 Tage alten Stämmen festgestellt werden kann (Abbildung 22 A). Im Gegensatz dazu zeigt der *PaAtg24*-Deletionsstamm eine deutlich erhöhte Expression um das 2,7-fache in 7 Tage alten Stämmen. Bei 14 Tage alten $\Delta PaAtg24$ kommt es hingegen zu einer statistisch signifikant verringerten *PaAtg8*-Expression im Vergleich zum Wildstamm (Abbildung 22 A). Bei Betrachtung der PaATG8-Proteinmenge zeigt sich, dass diese in $\Delta PaAtg24$ keinen Unterschied zwischen 7 und 14 Tage alten Stämmen aufweist (Abbildung 22 B, C). Im Wildtyp kommt es in 14 Tage alten Stämmen zu einer Verringerung der PaATG8-Menge, welche in

$\Delta PaAtg24$ nicht beobachtet werden kann (Abbildung 22 B, C). Der Verlust von PaATG24 führt zu einer gleichbleibenden Menge von PaATG8 während der Alterung.

Insgesamt zeigt sich, dass in juvenilen $\Delta PaAtg24$ die *PaAtg8*-Expression erhöht ist, aber in der Proteinmenge kein Unterschied zum Wildstamm festgestellt werden kann. In 14 Tage alten Deletionsstämmen kommt es hingegen zu einer deutlich geringeren *PaAtg8*-Expression, während in der Proteinmenge kein Unterschied bei der Alterung vorliegt. Durch den Autophagiedefekt in $\Delta PaAtg24$ ist der Abbau von PaATG8-assoziierten Autophagosomen in der Vakuole möglicherweise beeinträchtigt, wodurch der im Wildstamm beobachtete Rückgang der PaATG8-Menge nicht erfolgen kann.

Um den Abbau von PaATG8 in $\Delta PaAtg24$ feststellen zu können, erfolgte die Erstellung einer Doppelmutante mit dem Reporterstamm *Gfp::PaAtg8* (Abbildung S1 I). Durch die Doppelmutante $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ kann mit Hilfe des zuvor bereits für die selektive und nicht-selektive Autophagie beschriebenen „GFP-cleavage-Assays“ analysiert werden, ob es zu einem Abbau von PaATG8 in der Vakuole kommt. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 A, B dargestellt. Um ausschließen zu können, dass die Menge an GFP::PaATG8 durch den Verlust von PaATG24 die Auswertung des GFP-cleavage-Assays beeinflusst, erfolgte die Bestimmung des „freien GFPs“ im Verhältnis zum Gesamt-GFP (Fusionsprotein + „freies GFP“). Bei der Untersuchung des Abbaus von PaATG8 ist in der Wildtypkontrolle während der Alterung von 7 zu 14 Tagen keine signifikante Veränderung des Abbaus des PaATG8-Fusionsproteins in der Vakuole vorhanden (Abbildung 23 A, B). In 7 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ liegt signifikant weniger „freies GFP“ im Vergleich zum Kontrollstamm vor, somit findet bereits im jungen Altersstadium ein verringerter Abbau von GFP::PaATG8 bei Verlust von PaATG24 statt. Während der Alterung des *PaAtg24*-Deletionsstammes kommt es zu einer weiteren Reduktion des PaATG8-Abbaus in der Vakuole. Der Abbau von GFP::PaATG8 sinkt um 44 % von den 7 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp/PaAtg8$ -Stämmen zu den 14 Tage alten Deletionsstämmen. Wenn man die Auswirkungen des Verlusts von PaATG24 im Vergleich zum Kontrollstamm betrachtet, zeigt sich, dass bei den 14 Tage alten Stämmen ein um 46 % geringerer Abbau von PaATG8 in der Vakuole stattfindet, wenn das sortierende Nexin fehlt (Abbildung 23 B). Da PaATG8 mit den Autophagosomen in *P. anserina* assoziiert ist, kann angenommen werden, dass ein verminderter PaATG8-Abbau aufgrund einer Beeinträchtigung des autophagischen Flusses vorliegt.

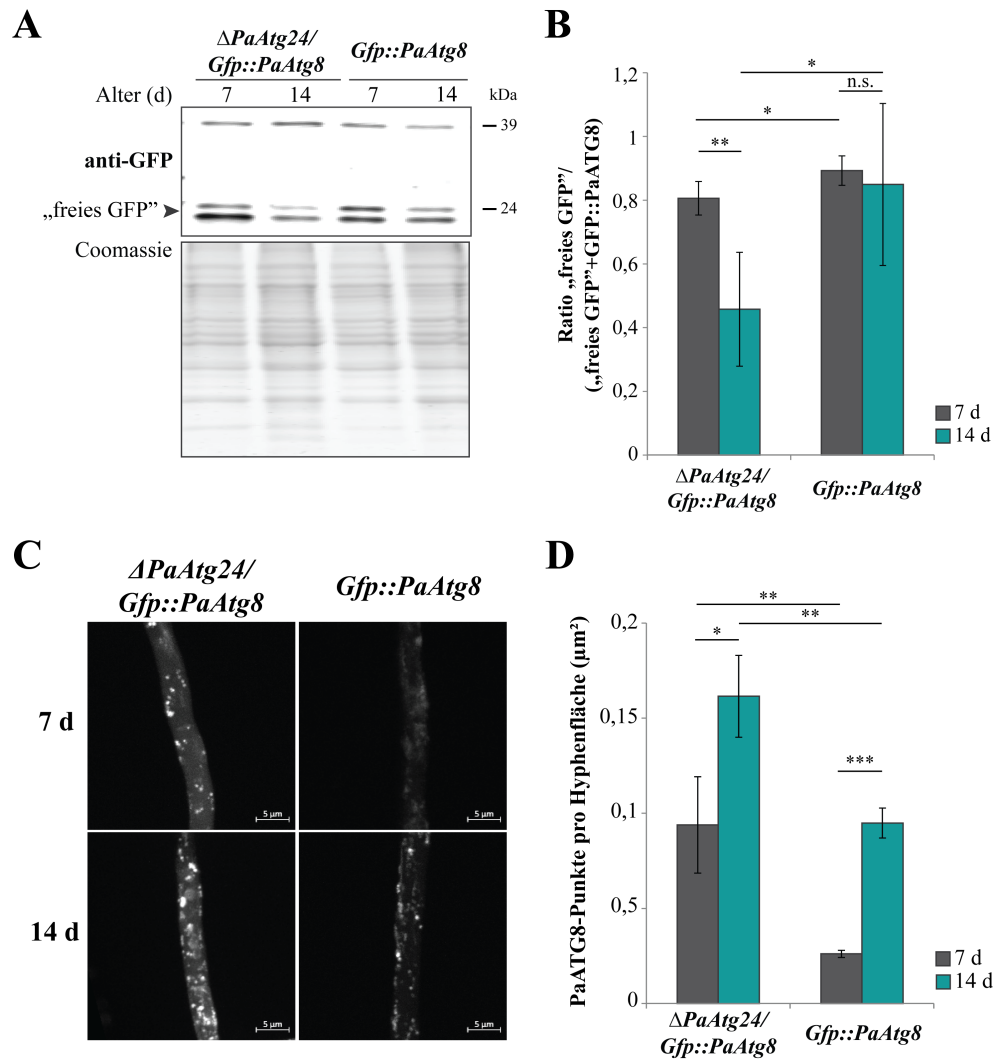


Abbildung 23: Verlust von PaATG24 führt zu einem reduzierten autophagosomalen Fluss und einer Akkumulation von Autophagosomen.

(A, B) Western Blot-Analyse und Quantifizierung von 50 μ g Gesamtprotein von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ und *Gfp::PaAtg8* ($n=4$, jeweils) nach Bestimmung des „freien GFPs“ im Verhältnis zum Gesamt-GFP (Fusionsprotein + „freies GFP“) und Normalisierung auf das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. (C, D) Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung von Autophagosomen in 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ und *Gfp::PaAtg8* ($n=3$, jeweils). Die Kultivierung erfolgte auf M2-Medium, die Belichtungszeit beträgt jeweils 3 ms und der Maßstab entspricht 10 μ m. Die statistische Analyse erfolgte durch einen zweiseitigen t -Test ($n. s.$ = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$). Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

Der autophagische Fluss, welcher den Transport von Autophagosomen und die Fusion und anschließenden Abbau in der Vakuole umfasst, ist in *P. anserina* demnach partiell von PaATG24-abhängig. Um festzustellen, inwiefern der Verlust von PaATG24 einen Einfluss auf die Autophagosomen hat, wurde im nächsten Schritt durch eine mikroskopische Analyse untersucht, ob in der *PaAtg24*-Deletionsmutante eine Bildung von Autophagosomen möglich ist (Abbildung 23 C, D). Um auszuschließen, dass es sich bei den dargestellten GFP-Signalen um vakuoläres GFP handelt, wurde eine Färbung mit FM4-64 durchgeführt. Dieser Lipid-bindende Farbstoff

wird durch Endozytose aufgenommen und gelangt durch das endosomale Sortiersystem zur Vakuolenmembran, in welcher er akkumuliert (Vida und Emr 1995). Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten GFP-Punkten um Autophagosomen handelt, wurde zunächst überprüft, ob eine Co-Lokalisation von GFP::PaATG8 und FM4-64 vorliegt (Abbildung S4). Da dies nicht der Fall ist, konnte anschließend die Untersuchung der Vakuolen in $\Delta PaAtg24$ durchgeführt werden. Während in dem 7 Tage alten Kontrollstamm *Gfp::PaAtg8* nahezu keine GFP-Punkte zu erkennen sind, kommt es während der Alterung zur Bildung von einigen, wenigen Autophagosomen (Abbildung 23 C). In $\Delta PaAtg24$ hingegen sind bereits im jüngeren Altersstadium GFP-Punkte erkennbar und im Laufe der Alterung kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Autophagosomenzahl (Abbildung 23 C). Um einen genaueren Eindruck der Autophagosomenakkumulation zu erhalten, erfolgte eine Quantifizierung der GFP::PaATG8-Punkte in den untersuchten Stämmen (Abbildung 23 D). Hierzu wurden mit Hilfe des Programms ImageJ 1.520 alle GFP-Punkte mit einer Größe von 0,2–1,5 μm digital bestimmt und in Relation zur untersuchten Hyphenfläche gesetzt. Diese Größe wurde gewählt, damit bereits in der Vakuole vorliegende GFP-Signale nicht als Autophagosomen mitgezählt wurden.

Durch die Zählung der Autophagosomen zeigt sich, dass es während der Alterung des Kontrollstamms die Autophagosomenzahl steigt. Im Vergleich zu den 7 Tage alten *Gfp::PaAtg8* liegen in den 14 Tage alten Stämmen eine 3,7-fache Anzahl an Autophagosomen vor (Abbildung 23 D). Durch den Verlust von PaATG24 kann bereits in den 7 Tage alten Stämmen eine höhere Zahl an Autophagosomen festgestellt werden im Vergleich zum Kontrollstamm. Dies entspricht in 7 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ der 3,6-fachen Autophagosomenzahl im Vergleich zu *Gfp::PaAtg8*. Bei der Alterung des Deletionsstammes kommt es zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Autophagosomenzahl. So ist bei den 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ die 1,7-fache Anzahl an Autophagosomen im Vergleich zu den 7 Tage alten Deletionsstämmen vorhanden. Bei dem Vergleich der 14 Tage alten Stämme zueinander, führt der Verlust von PaATG24 zu der 1,7-fachen Anzahl an Autophagosomen im Vergleich zum Kontrollstamm.

Zusammenfassend zeigt sich, dass durch den Verlust von PaATG24 weniger PaATG8 in die Vakuole gelangt und abgebaut wird. Bei der Betrachtung der Autophagosomen in $\Delta PaAtg24$ zeigt sich, dass eine Autophagosomenakkumulation eine Erklärung für den Autophagiedefekt

dieses Stammes sein kann. Neben einer möglichen Erhöhung der Autophagosomenbildung in $\Delta PaAtg24$, kann auch eine Beeinträchtigung der Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole diesen Anstieg der Autophagosomen hervorrufen. Um diese Möglichkeit näher zu betrachten, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der Verlust von PaATG24 einen Einfluss auf die Vakuole hat und inwiefern der Autophagiedefekt der *PaAtg24*-Deletionsmutante auf diesen Schritt der Autophagie zurückgeführt werden kann.

3.3.5 Betrachtung der Vakuole als Komponente des autophagischen Abbauweges

3.3.5.1 Untersuchung zur zellulären Lokalisation von PaATG24 im Vergleich zur Vakuole

Da festgestellt werden konnte, dass der Verlust von PaATG24 zu einem verminderten autophagosomalen Fluss und einer Akkumulation von Autophagosomen führt, wurde im nächsten Schritt zunächst die Lokalisation von PaATG24 bestimmt. Hierzu erfolgte die Erstellung und initiale Charakterisierung eines GFP-gekoppelten PaATG24 von Miriam Brunner im Zuge ihrer Masterarbeit (Brunner 2016). Durch initiale Untersuchungen in dieser Masterarbeit konnte festgestellt werden, dass PaATG24 in punktförmigen Strukturen im Cytoplasma vorliegt. In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde nun die Lokalisation dieses sortierenden Nexins im Zusammenhang zur Vakuole untersucht, durch die Verwendung des bereits angesprochenen Farbstoffs FM4-64 (Abbildung 24). Die Untersuchung von PaATG24::GFP zeigt, dass dieses sortierende Nexin in *P. anserina* in punktförmigen Strukturen vorliegt (Abbildung 24). Diese befinden sich in beiden untersuchten Altersstadien hauptsächlich in räumlicher Nähe der Vakuolen. Aufgrund dieser Lokalisation und den Autophagiedefekt von $\Delta PaAtg24$ scheint es plausibel, dass PaATG24 an der Fusion und Abbau von Autophagosomen in der Vakuole beteiligt ist. Daher wurde im Folgenden dieser Schritt der Autophagie näher betrachtet.

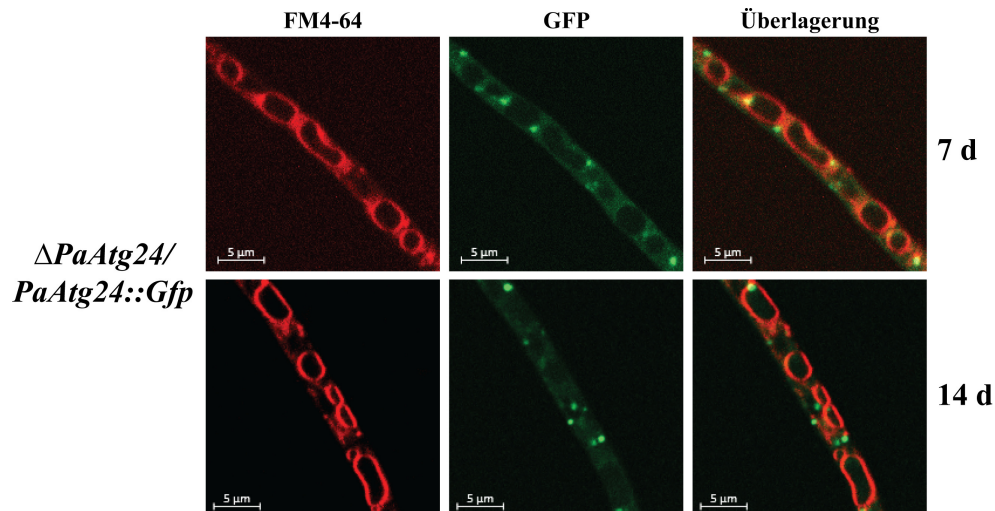


Abbildung 24: PaATG24 ist in der Nähe der Vakuolen lokalisiert.

Mikroskopische Analyse von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/PaATG24::Gfp$ ($n = 3$, jeweils). Die Alterung der Stämme erfolgte auf M2-Medium und einen Tag vor Mikroskopie auf Muldenobjektträger mit M2-Medium. Die Färbung der Vakuolenmembranen erfolgte mit $2 \mu\text{g/ml}$ FM4-64 für 5 h, der Maßstab entspricht $5 \mu\text{m}$.

3.3.5.2 Untersuchung zum Einfluss von PaATG24 auf die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion

Der letzte Schritt der Autophagie stellt die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole und der anschließende Abbau der zellulären Bestandteile dar. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, handelt es sich bei der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion um einen komplexen Mechanismus, welcher aufgrund der Vielzahl an beteiligten Proteinen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Aufgrund der Akkumulation der Autophagosomen in $\Delta PaAtg24$ ist es möglich, dass dieses sortierende Nexin bei diesem Schritt der Fusion beteiligt ist. Für eine detaillierte Betrachtung der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion im $PaAtg24$ -Deletionsstamm, erfolgte eine mikroskopische Analyse von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ und $Gfp::PaAtg8$ nach Kultivierung für einen Tag auf M2-Medium mit verringerter Stickstoffmenge (M2-N \downarrow). Dabei enthält dieses Medium kein Harnstoff als Stickstoffquelle, damit es zur Autophagieinduktion und Vakuolenbildung kommt. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung des GFP-Signals in der Vakuole im Vergleich zum Gesamt-GFP-Signal der untersuchten Hyphen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 25 dargestellt. Bei der Wahl dieser Kulturbedingungen zeigt sich, dass in der Wildtypkontrolle eine Bildung von Vakuolen bereits im juvenilen Stadium von 7 Tagen erfolgt. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass das GFP-Signal hauptsächlich in der Vakuole vorliegt. Da es sich bei der Autophagie

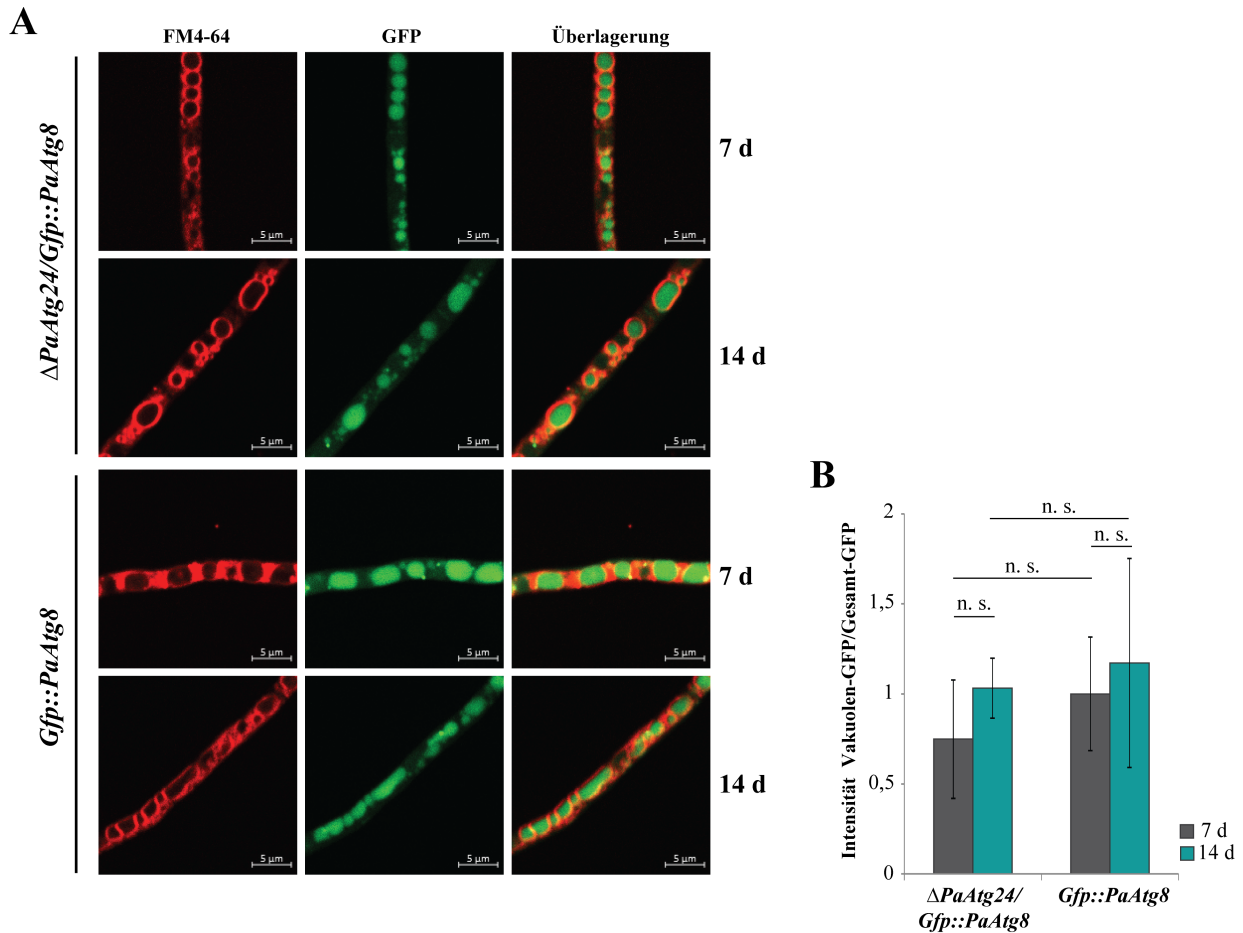


Abbildung 25: Die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion ist PaATG24-unabhängig.

(A, B) Mikroskopische Analyse und Quantifizierung von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ und $Gfp::PaAtg8$ ($n=3$, jeweils) nach Kultivierung für einen Tag auf M2-N \downarrow -Medium. Die Färbung der Vakuolenmembran erfolgte mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FM4-64 für 5 h. Zur Analyse der GFP-Intensität wurden 467 Vakuolen in 7440 μm^2 Hyphen in 7 Tage alte $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ und $Gfp::PaAtg8$ (861 Vakuolen in 9010 μm^2 Hyphen) untersucht. Des Weiteren erfolgte die Analyse von $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ (528 Vakuolen in 9710 μm^2 Hyphen) und 792 Vakuolen in 10576 μm^2 Hyphen von $Gfp::PaAtg8$ in 14 Tage alten Stämmen. Zur Quantifizierung wurde die vakuoläre GFP-Intensität in Relation zur Gesamt GFP-Intensität der Hyphen betrachtet und der 7 Tage alte $Gfp::PaAtg8$ -Stamm auf 1 gesetzt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger t -Test verwendet (n. s. = nicht signifikant). Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

nicht um ein einmaliges Ereignis handelt, können vereinzelt auch noch Autophagosomen festgestellt werden (Abbildung 25 A). Im $PaAtg24$ -Deletionsstamm sind ebenfalls in beiden untersuchten Altersstadien PaATG8-Punkte feststellbar. Bei der Betrachtung der Vakuolen von $\Delta PaAtg24$ fällt auf, dass in diesen, wie beim Kontrollstamm, GFP enthalten ist. Falls eine Beeinträchtigung der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion durch den Verlust von PaATG24 vorliegt, kann dieser nur partiell sein, denn es ist weiterhin möglich, dass GFP::PaATG8 in die Vakuolen von $\Delta PaAtg24$ gelangt. Um bestimmen zu können, ob und inwiefern PaATG24 einen Einfluss auf diesen Prozess hat, erfolgte eine Quantifizierung der GFP-Intensitäten in den Vakuolen durch die ZenBlue-Software von Zeiss. Dabei wurde die Intensität der GFP-Signale

in den Vakuolen von jeweils drei unabhängigen Stämmen quantifiziert und in Relation zur Gesamt-GFP-Intensität der Hyphen betrachtet (Abbildung 25 B). Obwohl sowohl bei 7, als auch bei 14 Tage alten $\Delta PaAtg24$ -Stämmen eine Verringerung der vakuolären GFP-Intensität im Vergleich zur Gesamt-Intensität vorliegt, ist bei beiden untersuchten Altersstadien keine signifikante Reduktion zur Wildtypkontrolle vorhanden (Abbildung 25 B). Dies zeigt, dass auch PaATG24-unabhängig eine Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole möglich ist und der Autophagiedefekt der Deletionsmutante nicht auf einen verminderten Transport von Autophagosomen und der Fusion mit der Vakuole zurückzuführen ist.

3.3.5.3 Die Bedeutung von PaATG24 für die Vakuolen von *P. anserina*

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass der Autophagiedefekt von $\Delta PaAtg24$ unabhängig vom Autophagosomentransport und der Fusion mit der Vakuole ist. Während der Analyse der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion des *PaAtg24*-Deletionsstammes fiel auf, dass die Vakuolen in $\Delta PaAtg24$ scheinbar eine veränderte Morphologie aufweisen und dieses Phänomen möglicherweise eine Ursache für die verminderte Autophagierate dieses Stammes ist.

Um dies genauer analysieren zu können, erfolgte eine Untersuchung der Vakuolen von 7 und 14 Tage alten Stämmen des Wildtyps und der *PaAtg24*-Deletionsmutante. Dazu wurde, wie zuvor bei der Analyse der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion, die Induktion der Vakuolen durch Kultivierung der Stämme für einen Tag vor Mikroskopie auf Muldenobjektträger mit Stickstoff-Mangelmedium (M2-N \downarrow) durchgeführt. Zur Färbung der Vakuolenmembran wurden die Stämme mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FM4-64 für 5 h inkubiert. Die Präparate wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht und anschließend die Vakuolen digital mit der Software ZenBlue von Zeiss vermessen. Dadurch konnte die Größe der Vakuolen festgestellt werden und die Vakuolenfläche in Abhängigkeit zur Gesamthyphenfläche bestimmt werden (Abbildung 26).

Die Vakuolen des Wildstammes zeigen bei beiden untersuchten Altersstadien eine ovale Form, welche bei 7 Tage alten Stämmen 30 % der Hyphenfläche ausmachen (Abbildung 26 A, B). Während der Alterung kommt es im Wildstamm zu einem Anstieg der Vakuolenfläche auf 38 % der Hyphenfläche und zeigt eine altersbedingte Erhöhung der Vakuolenfläche pro Hyphenfläche. Neben der Betrachtung der Vakuolenfläche erfolgte auch eine Kategorisierung

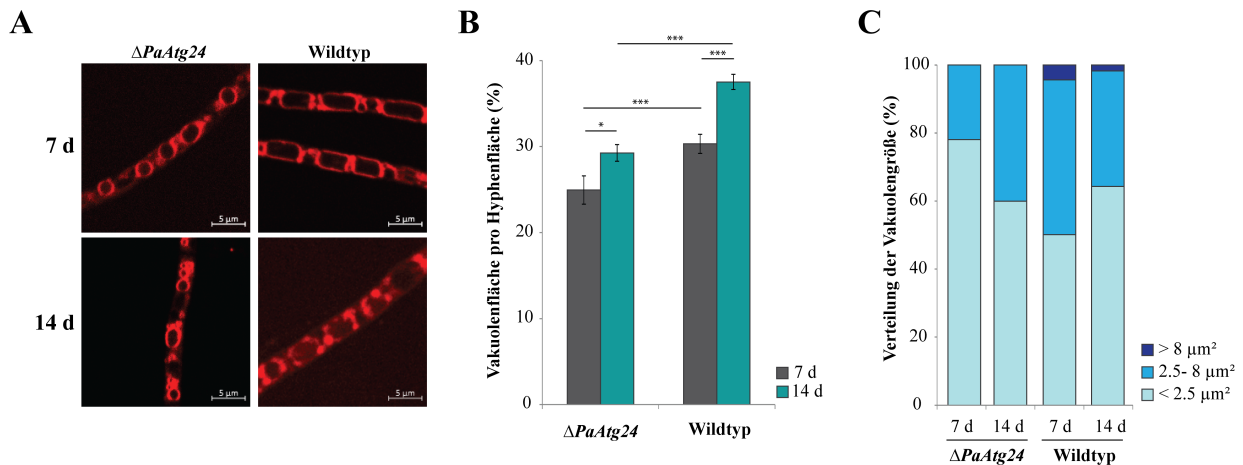


Abbildung 26: PaATG24 reguliert die Größe und Morphologie von Vakuolen.

(A) Darstellung repräsentativer Vakuolen des Wildtyps und des $\Delta PaAtg24$ -Stammes im Alter von 7 und 14 Tagen nach Inkubation auf M2-N \downarrow -Medium für einen Tag vor Mikroskopie zur Vakuoleninduktion. Die Färbung der Vakuolenmembran erfolgte mit 2 $\mu g/ml$ FM4-64 für 5 h. (B, C) Bestimmung der Verteilung der Vakuolenfläche im Verhältnis zur Hyphenfläche, sowie der Vakuolengröße von 7 Tage alten $\Delta PaAtg24$ (3650,1 μm^2 Hyphen) und 3630,2 μm^2 Hyphen des Wildstammes, sowie von 2612,1 μm^2 Hyphen von $\Delta PaAtg24$ und des Wildstammes (2809,3 μm^2 Hyphen) von 14 Tage alten Stämmen (n = 3, jeweils). Für die Größe der Vakuolen wurden drei Kategorien gewählt: kleiner als 2,5 μm^2 , 2,5-8 μm^2 und größer als 8 μm^2 . Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet (* = p \leq 0,05; *** = p \leq 0,001). Modifiziert nach Henkel et al. (2020).

der Vakuolengrößen (Abbildung 26 C). Dabei besitzen kleine Vakuolen eine Größe von weniger als 2,5 μm^2 , mittlere Vakuolen haben eine Größe von 2,5-8 μm^2 und große Vakuolen sind größer als 8 μm^2 . Der 7 Tage alte Wildstamm besitzt 50 % kleine Vakuolen, 45 % mittlere und 5 % der Vakuolen sind größer als 8 μm^2 (Abbildung 26 C). Während der Alterung verändert sich diese Verteilung und es können mehr kleine Vakuolen festgestellt werden, sodass beim 14 Tage alten Wildstamm 64 % der Vakuolen in die kleinste Kategorie fallen, 34 % mittelgroße Vakuolen und 2 % große Vakuolen vorkommen.

Bei der Betrachtung der Vakuolen des *PaAtg24*-Deletionsstammes fällt auf, dass diese eine veränderte Morphologie aufweisen (Abbildung 26 A). Sie zeigen eine deutlich rundere, Knopf-ähnliche Struktur und die Analyse der Vakuolengröße zeigt, dass die Vakuolen eine im Vergleich zum Wildstamm verringerte Hyphenfläche ausmachen. In 7 Tage alten Deletionsstämmen entsprechen die Vakuolen 25 % der gemessenen Hyphenfläche und im Alter von 14 Tagen sind es 29 % (Abbildung 26 B). Auch die Verteilung der Vakuolengröße ist in $\Delta PaAtg24$ verändert (Abbildung 26 C). In 7 Tage alten Stämmen sind 78 % der Vakuolen kleiner als 2,5 μm^2 , 22 % entsprechen der mittleren Kategorie und es sind keine Vakuolen größer als 8 μm^2 . Auch bei 14 Tage alten $\Delta PaAtg24$ sind keine großen Vakuolen vorhanden, des Weiteren

sind 60 % der Vakuolen kleiner als $2,5 \mu\text{m}^2$ und 40 % der Vakuolen sind zwischen $2,5$ und $8 \mu\text{m}^2$.

Die Untersuchung der Vakuolen zeigt, dass der Verlust von PaATG24 einen erheblichen Einfluss auf die Vakuolenmorphologie und Vakuolengröße hat, was im Endeffekt zu den beobachteten Defekten in der Autophagie führt. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Autophagie nicht nur von dem Prozess der Autophagosomenbildung, -transport und abschließend der Fusion mit der Vakuole abhängt. Stattdessen ist die Vakuole selbst immens wichtig, damit der autophagische Fluss gewährleistet ist und es zu keinem Rückstau kommt. Der Abbau von zellulären Bestandteilen in der Vakuole stellt einen Flaschenhals der Autophagie dar und PaATG24 ist ein Protein, welches die Morphologie und Größe der Vakuole und somit auch die Funktionalität der Vakuole gewährleistet.

Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde die Fragestellung untersucht, inwiefern Autophagie-relevante Proteine einen Einfluss auf die Lebensspanne und die nicht-selektive Autophagie und Mitophagie des filamentösen Ascomyceten *P. anserina* besitzen. Für diese Analysen wurden Proteine untersucht, welche direkt und indirekt mit der Autophagie in Verbindung stehen und die verschiedenen Schritte des autophagischen Abbauweges detailliert betrachtet. Durch die molekularbiologische Untersuchung zum Einfluss von PaATG8, PaATG11 und PaATG24 auf die nicht-selektive Autophagie und den Autophagie-assoziierten Abbau von Mitochondrien zeigt sich, dass die Autophagie des Alternsmodell *P. anserina* ein Zusammenspiel komplexer Prozesse zum Abbau von zellulären Bestandteilen darstellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der endosomale Sortiervorgang bedeutend für die Autophagie und vor allem die Vakuolen ist und von dem sortierenden Nexin PaATG24 abhängt.

Die in dieser Dissertation untersuchten Proteine zeigten bereits in *S. cerevisiae* eine Assoziation mit dem autophagischen Abbauweg. Die Autophagie als Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen ist jedoch weiterhin wenig verstanden und daher erfolgten die dargestellten Untersuchungen, um die Autophagie und ihre biologische Rolle im Bereich der Aufrechterhaltung der normalen Lebensspanne des Alternsmodell *P. anserina* zu analysieren. Hierzu wurden zunächst Deletionsmutanten von *PaAtg8* und *PaAtg11* erstellt, sowie ein bereits vorhandener Deletionsstamm $\Delta PaAtg24$ analysiert. Bei diesen drei Stämmen wurde untersucht, welchen Einfluss der Verlust der Proteine auf die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie von *P. anserina* hat. In weiterführenden Studien wurde untersucht, inwiefern der Verlust des Mitophagie-assoziierten Proteins PaATG11 und des sortierenden Nexins PaATG24 in der Kombination $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ die Mitochondrienfunktion beeinflusst und sich auf die Mitochondrienmorphologie auswirkt. Abschließend erfolgte eine detaillierte Untersuchung der *PaAtg24*-Deletionsmutante im Hinblick auf die Beeinträchtigung des autophagischen Flusses, sowie die Untersuchung der Vakuolen als finalen Ort des autophagosomalen Abbauprozesses.

4.1 *P. anserina* hat einen PaATG8-unabhängigen Mechanismus zum Abbau von Mitochondrien in den Vakuolen

Autophagie beschreibt den Abbau zellulärer Bestandteile, entweder in der Vakuole (bei Pflanzen und Pilzen) oder dem Lysosom in eukaryotischen Zellen (Cuervo und Wong 2014; Galluzzi et al. 2017). Damit dieser Abbau stattfinden kann, werden im Bereich der Makroautophagie die abzubauenen zytoplasmatischen Bestandteile von einer autophagosomalen Membran umschlossen und das so gebildete Autophagosom anschließend zu dem Ort des Abbaus transportiert, an dem die Fusion mit der Vakuole/Lysosom erfolgt. Zum Aufbau des Autophagosoms sind verschiedene Proteinsignalkaskaden nötig und ATG8 ist ein zentrales Protein der Autophagosomenbildung. Um den Einfluss von PaATG8 auf die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie von *P. anserina* tiefergehend untersuchen zu können, wurde eine *PaAtg8*-Deletionsmutante erstellt und anschließend charakterisiert. $\Delta PaAtg8$ zeigt ein hell pigmentiertes Myzel und eine verringerte Menge an Luftmyzel (Abbildung 7). Der Verlust von PaATG8 führt zu einem verlangsamten Wachstum, ein Befund, der vorherigen Untersuchungen von Pinan-Lucarré et al. (2003) bestätigt.

Bei der initialen Studie von Pinan-Lucarré et al. (2003) wurde PaATG8, damals noch als PaIDI-7 bezeichnet, für die Untersuchung zum Zusammenhang einer Autophagieinduktion bei der zellulären Inkompatibilität zwischen zwei Stämmen untersucht. Dabei wurde bereits genutzt, dass PaATG8 als Autophagosomen-assoziiertes Protein bei einer Autophagie-Induktion in die Vakuole transportiert wird. In den frühen Untersuchungen zu PaATG8 war der Einfluss der Autophagie auf die Lebensspanne von *P. anserina* noch nicht untersucht worden. Erste Untersuchungen zum Zusammenhang von Autophagie und der Lebensspanne in *P. anserina* wurden von Knuppertz et al. (2014) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Verlust von PaATG1 zu einer signifikanten Verkürzung der Lebensspanne dieses Modellorganismus führt.

Die Untersuchungen in dieser Doktorarbeit haben gezeigt, dass es auch in $\Delta PaAtg8$ zu einer statistisch signifikanten Lebensspannenverkürzung kommt, sowie des typischen Phänotyps von Autophagie-defizienten Stämmen (Abbildung 7). Während ATG1 als Serin/Threonin-Proteinkinase primär bei den initialen Schritten der Autophagosomenbildung beteiligt ist und somit einen regulatorischen Einfluss auf die Autophagie hat, ist ATG8 durch den

C-terminalen Lipidanker direkt mit dem Autophagosom verbunden. Somit ist die Lebensspanne von *P. anserina* auch verkürzt, wenn zwar die initialen Schritte der Autophagosomenbildung eingeleitet werden können, aber die Zusammensetzung des Autophagosoms an sich beeinträchtigt ist. Diese Untersuchungen bestätigen, dass die Lebensspannenverkürzung der *PaAtg1*-Deletionsmutante auf dem Defekt der Autophagosomenbildung basieren.

Aufgrund der Untersuchungen zu ATG8 in zahlreichen Organismen war anzunehmen, dass dieses Protein auch in *P. anserina* eine zentrale Rolle in der Autophagie spielt. Darauf weisen auch die Untersuchungen von Pinan-Lucarré et al. (2003) hin, welche GFP::PaATG8 als Markerprotein für eine Autophagieinduktion bei zellulärer Inkompatibilität nutzten. Dennoch wurde bisher nicht gezeigt, dass PaATG8 direkt für die nicht-selektive und selektive Autophagie von *P. anserina* benötigt wurde. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Doppelmutanten $\Delta PaAtg8/PaSod1::Gfp$ und $\Delta PaAtg8/PaSod3^{H26L}::GFP$ erstellt und die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie durch die zwei etablierten Reporterproteine per Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 8).

Durch das bereits zuvor etablierte GFP-cleavage-Assay war es so möglich, den Abbau von cytoplasmatischen Zellbestandteilen und Mitochondrienproteinen in der Vakuole darzustellen. Die Untersuchung zur nicht-selektiven Autophagie zeigte, dass altersunabhängig kein Abbau von PaSOD1::GFP in der Vakuole von $\Delta PaAtg8$ stattfindet. Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass PaATG8 essenziell für die nicht-selektive Autophagie in *P. anserina* ist und PaATG8 bei dieser Autophagieform eine vergleichbare Funktion zu ATG8-Proteinen aus anderen Organismen besitzt. Die Funktion von ATG8 scheint somit evolutionär konserviert zu sein. Aufgrund der Vorteile von *P. anserina* als Modellorganismus ist es in Zukunft möglich komplexere Untersuchungen zur Autophagie in dem $\Delta PaAtg8$ -Stamm durchzuführen.

Durch die Betrachtung von selektiven Autophagieformen kann ein weiteres Verständnis der Rekrutierung des PAS und der Umhüllung des abzubauenen Organells erhalten werden, da diese Abläufe noch nicht vollständig aufgeklärt sind. In der zuvor beschriebenen Studie zu PaATG1 konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Deletion von *PaAtg1* zu einem Verlust der nicht-selektiven Autophagie führt und zu einer Beeinträchtigung der Mitophagie (Knuppertz 2017; Knuppertz et al. 2014). Dabei wurde festgestellt, dass zu einem geringen Anteil eine PaATG1-unabhängige Mitophagie stattfinden kann, wie es auch bei der Bäckerhefe *S. cerevisiae*

beobachtet werden konnte (Hughes et al. 2016; Lemasters 2014). Dabei scheint ein alternativer und Autophagosomen-unabhängiger Abbauweg von Mitochondrien in der Vakuole vorzuliegen, möglicherweise über zwei bereits beschriebene, jedoch noch wenig erforschte Abbauwege. Zum einen kann der Abbau der mitochondrialen Proteine direkt über die vakuoläre Membran durch eine Invagination erfolgen, ein Vorgang, welcher Mikromitophagie bezeichnet wird. Zum anderen sind mitochondriale Vesikel beschrieben, durch welche mitochondriale Proteine zur Vakuole transportiert werden, ohne einen Einschluss in ein Autophagosom. Dabei handelt es sich um die sogenannten *mitochondria-derived-vesicles* (MDVs) (Hughes et al. 2016; McLelland et al. 2014; Neuspiel et al. 2008; Soubannier et al. 2012a; Yamashita et al. 2016). Aufgrund der ersten Erkenntnisse zu einem alternativen Abbauweg von Mitochondrien im $\Delta PaAtg1$ -Stamm erfolgte die Untersuchung der Mitophagie des *PaAtg8*-Deletionsstammes. Dabei sollte untersucht werden, ob ein Autophagosomen-unabhängiger Transport von mitochondrialen Proteinen in die Vakuole in *P. anserina* möglich ist.

Im Gegensatz zur nicht-selektiven Autophagie findet in $\Delta PaAtg8$ sowohl im juvenilen Altersstadium, als auch bei 14 Tage alten Stämmen ein Abbau von mitochondrialen Proteinen in der Vakuole statt (Abbildung 9). *P. anserina* ist somit in der Lage mitochondriale Proteine PaATG8-unabhängig in die Vakuole zu transportieren. Durch das untersuchte „freie GFP“ zeigt sich, dass der Anteil der PaATG8-unabhängigen Mitophagie etwa die Hälfte der beobachteten Mitophagiemenge des Kontrollstammes auszumachen scheint. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es möglicherweise in der $\Delta PaAtg8$ -Mutante zu einer Hochregulierung der Autophagosomen-unabhängigen Abbauwege kommt, um den Verlust der PaATG8-abhängigen selektiven Autophagie der Mitochondrien zu kompensieren. Betrachtet man die Mitophagie als Teil der mitochondrialen Qualitätskontrolle, führt der Verlust dieses Recyclingweges zu einer Akkumulation von geschädigten Mitochondrien. Daher ist anzunehmen, dass die Beeinträchtigung der Makromitoautophagie durch entweder MDVs oder Mikromitophagie partiell kompensiert werden kann.

MDVs sind in verschiedenen Organismen beschrieben, wie *H. sapiens*, *A. thaliana* und *S. cerevisiae* (Hughes et al. 2016; McLelland et al. 2014; Neuspiel et al. 2008; Soubannier et al. 2012a; Yamashita et al. 2016). Eine Aktivierung von alternativen Abbaumechanismen für geschädigte Mitochondrien scheint somit ein konservierter Mechanismus zu sein, um die

Homöostase von Mitochondrien aufrecht zu erhalten. In Studien zu MDVs in *H. sapiens* wurde gezeigt, dass der Abbau dieser Vesikel zwar LC3-unabhängig erfolgt, zur Bildung jedoch der PINK1/Parkin-Signalweg benötigt wird, welcher auch bei der makroautophagischen Mitophagie aktiviert wird (McLelland et al. 2014; Soubannier et al. 2012a). Dieser Signalweg der mitochondrialen Qualitätskontrolle, welcher nur für Säuger beschrieben ist, tritt auf, wenn es zu einer Depolarisation der Mitochondrien kommt. Wenn dieser Signalweg ausgelöst wird, folgt eine Bildung von MDVs und ein Abbau der geschädigten Mitochondrien in der Vakuole (Kondapalli et al. 2012). Im Fall des PINK1/Parkin-abhängigen Vesikeltransport durch MDVs wird das Mitochondrium abgeschnürt und direkt zum späten Endosom/Lysosom transportiert. Dies geschieht, ohne, dass es zur Bildung eines Autophagosoms kommt (McLelland et al. 2016; Soubannier et al. 2012a,b). Somit ist das PINK1/Parkin-Rezeptorsystem in *H. sapiens* zur Detektion beschädigter Mitochondrien bei zwei Abbauwegen beteiligt. In *S. cerevisiae* hingegen wird die Bildung von MDVs weniger durch die mitochondriale Depolarisation ausgelöst, als vielmehr durch vakuolären Stress. Eine ScDNM1-abhängige Abschnürung der Mitochondrien erfolgt ScATG32-unabhängig (Hughes und Gottschling 2012; Hughes et al. 2016). Die Bildung von MDVs scheint ein grundlegender Mechanismus zu sein, denn auch in *A. thaliana* wurden diese Vesikel beschrieben (Yamashita et al. 2016). Dennoch sind weiterhin viele Fragen zu den MDVs offen, bei deren Beantwortung der $\Delta PaAtg8$ -Deletionsstamm möglicherweise helfen kann. Ein anderer Autophagosomen-unabhängiger Mechanismus stellt die Mikroautophagie dar. Insgesamt sind die Erkenntnisse zur Mikromitophagie gering, vor allem in Hyphenpilzen (Lemasters 2014). Es ist möglich, dass die Mikromitophagie vergleichbar zur Mikropexophagie abläuft, welche in *P. pastoris* genauer untersucht wurde (Ano et al. 2005; Mukaiyama et al. 2004; Nazarko et al. 2011). Für den Ablauf der Mikropexophagie muss die Vakuole zunächst spezielle Strukturen ausbilden, den sogenannten MIPA-Komplex. Dabei handelt es sich um eine Ausstülpung der vakuolären Membran, durch welche ein Peroxisom durch Mikroautophagie in die Vakuole gelangen kann und der anschließende Abbau stattfindet. Untersuchungen in *P. pastoris* haben gezeigt, dass im Falle der Pexophagie der mikroautophagische Abbau in der Vakuole eine bedeutende Rolle spielt (Ano et al. 2005). In *P. pastoris* ist mit PpATG35 ein spezifisches Protein für die Regulation der Bildung des MIPA vorhanden (Nazarko et al. 2011). In *P. anserina* wurde gezeigt, dass die makroautophagische Pexophagie im Wildstamm möglich

ist (Henkel et al. 2020; Schürmanns 2017). Jedoch liegen bisher keine Untersuchungen zur Mikropexophagie in diesem Modellorganismus vor. Mit Hilfe des *PaAtg8*-Deletionsstammes ist es möglich zu untersuchen, ob auch diese Form der Autophagie in *P. anserina* vorhanden ist und inwiefern die Ergebnisse von *P. pastoris* übertragbar sind. Der *PaAtg8*-Deletionsstamm stellt ein adäquates Werkzeug zur detaillierteren Untersuchungen der Makro- und der Mikroautophagie in *P. anserina* dar und hilft in Zukunft die Autophagie im Zusammenhang mit Alternsprozessen untersuchen zu können.

4.2 Auswirkung des PaATG11-Verlustes auf die selektiven und nicht-selektiven Autophagie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein PaATG8-unabhängiger Abbau von mitochondrialen Proteinen in der Vakuole möglich ist, sollte im nächsten Schritt ein Protein untersucht werden, welches als spezifisch für die selektive Autophagie gilt. Für diese Untersuchungen wurde das Protein ATG11 gewählt, welches in *S. cerevisiae* als Interaktionspartner des Mitophagierezeptorproteins ScATG32 die Rekrutierung des PAS zu den abzubauenen Mitochondrien koordiniert (Aoki et al. 2011; Matscheko et al. 2019; Zientara-Rytter und Subramani 2020). Die verschiedenen Phasen der Mitophagie sind in Abbildung 27 dargestellt. ATG11 ist an der Erkennung und Rekrutierung des PAS zum geschädigten Mitochondrium beteiligt.

Für eine Analyse der Beteiligung von ATG11 an der nicht-selektiven und selektiven Autophagie in *P. anserina* erfolgte zunächst die Erstellung und Charakterisierung einer *PaAtg11*-Deletionsmutante. Bei der Charakterisierung von $\Delta PaAtg11$ kann festgestellt werden, dass der Verlust des Adapterproteins PaATG11 keinen Einfluss auf den Phänotyp von *P. anserina* hat. Im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen von Autophagie-assoziierten Proteinen, wie PaATG8 und PaATG1, ist bei der *PaAtg11*-Deletionsmutante keine Veränderung der Pigmentierung oder Fertilität vorhanden (Knuppertz et al. 2014; Pinan-Lucarré et al. 2005). Auch die Lebensspanne und die Wachsrates sind in $\Delta PaAtg11$ unverändert, was darauf hindeutet, dass der Verlust von PaATG11 durch *P. anserina* bei Normalbedingungen kompensiert werden kann. Untersuchungen von anderen Pilzen, wie *F. graminearum*, einem Pflanzenpathogen, sowie

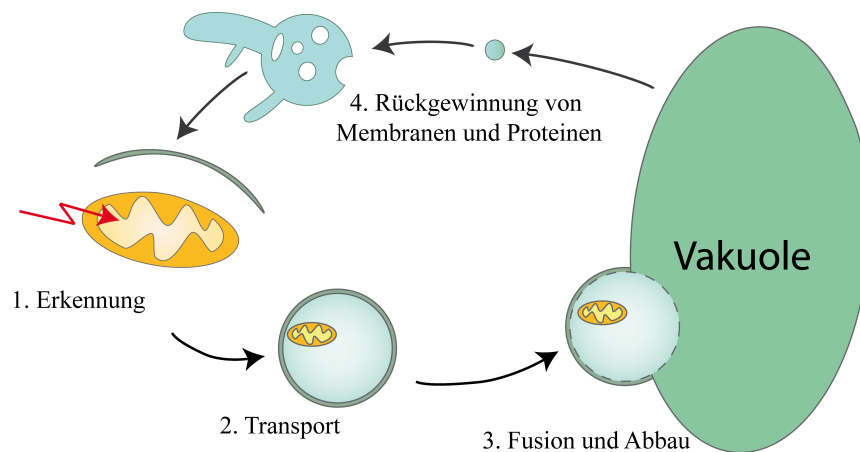


Abbildung 27: Übersicht der Phasen der Mitophagie.

Zunächst erfolgt die **1. Erkennung** des geschädigten Mitochondriums, welches dann mit einer autophagosomalen Membran umschlossen wird, bevor der **2. Transport** zur Vakuole stattfindet. Dort erfolgt die **3. Fusion und Abbau** des Autophagosoms, bevor abschließend eine **4. Rückgewinnung** der Proteine und Membranen zum Endosom erfolgt.

Candida albicans, ein pathogener Pilz des Menschen, zeigen, dass der Verlust von ATG11 nur geringe Beeinträchtigungen des Phänotyps verursacht, ebenso, wie dies bei *P. anserina* festgestellt werden konnte (Cui et al. 2019; Lv et al. 2017).

Die Beteiligung von ATG11 an der Autophagie ist besonders in *S. cerevisiae* gut untersucht. Dabei sind vor allem zwei hauptsächliche Aufgabenbereiche dieses Proteins beschrieben: Zum Einen ist ScATG11 durch die Interaktion mit ScATG32 eine Komponente der selektiven Autophagie und zum Anderen ist eine Beteiligung von ScATG11 am ScATG1-Komplex beschrieben, welcher die Initiation der Bildung des Autophagosoms unterstützt. Obwohl ScATG11 an der Rekrutierung von Proteinen und Lipiden zum PAS bei der Initiation der Autophagie beteiligt ist, führt der Verlust in *S. cerevisiae* und weiteren Pilzen, wie dem Ascomyceten *Aspergillus oryzae*, zu keiner Beeinträchtigung der nicht-selektiven Autophagie (He et al. 2006; Kim et al. 2001; Matscheko et al. 2019; Tadokoro et al. 2015). Bei der Untersuchung der Autophagie in unterschiedlichen Organismen stellt sich die Frage, inwiefern eine evolutionäre Konservierung dieses Abbauweges vorhanden ist. Es ist möglich, dass nur der generelle Ablauf dieses Prozesses konserviert ist, die einzelnen Komponenten jedoch unterschiedlich sind. Dabei ist zum Beispiel in höheren Eukaryoten insbesondere der ATG1-Komplex deutlich anders strukturiert als in *S. cerevisiae* und nur einige homologe Proteine sind beschrieben (Chan und Tooze 2009). Interessanterweise ähneln die Untereinheiten dieses Komplexes der Spaltheife *S. pombe* dem ULK1-Komplex von *H. sapiens* und sind somit deutlich

unterschiedlich zur Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Nanji et al. 2017). Eine bioinformatische Studie des Protein-Protein-Interaktionsnetzwerkes autophagischer Proteine von *P. anserina* hat wiederum gezeigt, dass bei diesem Ascomyceten eine hohe Übereinstimmung der Proteininteraktionen der Komponenten des PaATG1-Komplexes zur Bäckerhefe besteht (Philipp et al. 2017). Es wäre daher anzunehmen, dass PaATG11 ähnliche Aufgaben zur Bildung des PaATG1-Komplexes übernimmt, wie es in *S. cerevisiae* gezeigt ist (He et al. 2006; Mao et al. 2013; Matscheko et al. 2019). ATG11 hat verschiedene Aufgabenbereiche, welche weiterhin nicht völlig verstanden sind. Um einen Einblick in die Funktion von PaATG11 in der nicht-selektiven Autophagie von *P. anserina* zu erhalten, erfolgte eine Untersuchung dieser Autophagieform mit Hilfe des *PaSod1::Gfp*-Reporterstammes. Dabei zeigt sich, dass die nicht-selektive Autophagie in der *PaAtg11*-Deletionsmutante nur noch zu einem Drittel vorhanden ist. Diese Menge des autophagischen Flusses ist zwar ausreichend, um unter Normalbedingungen die Lebensspanne von $\Delta PaAtg11$ aufrecht zu erhalten, jedoch ein deutlicher Unterschied zu den Befunden in anderen Pilzen. Zum Beispiel hat eine *Atg11*-Deletion in *A. oryzae* und *P. pastoris* keinen Einfluss auf die nicht-selektive Autophagie (Kim et al. 2001; Tadokoro et al. 2015). Dieser Defekt in der nicht-selektiven Autophagie in *P. anserina* deutet darauf hin, dass PaATG11 eine umfangreichere Funktion in der Autophagosomenbildung besitzt, als es zum Beispiel bei *S. cerevisiae* der Fall ist. In Hefe gilt ScATG17 als primäres Adapterprotein für die nicht-selektive Autophagie, während PaATG11 hauptsächlich die selektive Autophagie vermittelt (Kim et al. 2001; Shintani und Klionsky 2004). Untersuchungen zeigen, dass es zwischen den beiden Proteinen um eine Konkurrenz um den ATG1-Komplex kommt (Matscheko et al. 2019). Hierbei ist jedoch ein Ungleichgewicht der Kopienzahl der beiden Proteine vorhanden, da pro Zelle 360 Proteine von ScATG17 vorliegen, während von ScATG11 nur eine Kopienzahl von 85 Proteinen pro Zelle vorhanden ist (Ghaemmaghami et al. 2003). Um dieses Verhältnis auszugleichen und die Autophagosomenbildung zu steuern, ist eine strikte Regulation der beiden Proteine nötig. Die Beeinträchtigung der nicht-selektiven Autophagie in $\Delta PaAtg11$ zeigt, dass die Funktion von PaATG11 in *P. anserina* möglicherweise teilweise mit der Funktion von ScATG17 überlappt. Neben der Funktion als Gerüstprotein des ATG1-Komplexes ist ScATG11 bei der Rekrutierung von ScATG9 zum PAS beschrieben. In *S. cerevisiae* ist gezeigt worden, dass der Verlust von ScATG11 zu einem Lipidmangel im Bereich der Autophagosomenbildung führt (He et al. 2006).

Dadurch kann nur eine geringe Anzahl an Autophagosomen gebildet werden. Wenn diese Funktion von PaATG11 analog ist, könnte es dadurch zum verminderten autophagischen Fluss kommen. Eine Untersuchung der Autophagosomen in $\Delta PaAtg11$ könnte Aufschluss über die Fähigkeit dieses Stammes zur Bildung von Autophagosomen geben. Eine aktuelle Studie zeigt, dass die ScATG9-ScATG11-Interaktion bei Stickstoffmangel-induzierter Autophagie irrelevant ist, aber bei einer Glucose-induzierten Autophagie die Rekrutierung von ATG9 durch ATG11 zum PAS erfolgt (Yao et al. 2020). Die Untersuchung eines *AtAtg11*-Deletionsstammes in *A. thaliana* zeigt wiederum eine signifikante Verringerung des Abbaus von GFP::AtATG8 unter Normalbedingungen, bei Stickstoffmangelbedingungen konnte jedoch kein Unterschied zum Wildstamm mehr festgestellt werden (Kang et al. 2018). Dies verdeutlicht, dass vor allem die Experimentbedingungen bei der Betrachtung der ATG11-Funktion eine wichtige Rolle spielen und vor allem die übliche Autophagie-Induktion durch Stickstoffmangel nur ein Teilbild des autophagischen Prozesses darstellt.

In *P. anserina* ist die Mitophagie bisher nur wenig erforscht und es ist unklar, in welchem Maße ein Wechselspiel von nicht-selektiver zu selektiver Autophagie stattfindet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Einfluss der PaATG11-Verlust auf die Mitophagie von *P. anserina* hat. Die Untersuchung der Mitophagie im *PaAtg11*-Deletionsstamm zeigt, dass die Mitophagie durch den Verlust des Adapterproteins in jungen Stämmen um 34 % verringert ist. Somit ist PaATG11 im Bereich der Mitophagie nur ein unterstützendes Protein und übernimmt nicht die Funktion eines Mitophagierezeptorproteins. Bei der Betrachtung des mittleren Altersstadiums zeigt sich, dass in der *PaAtg11*-Deletionsmutante kein Anstieg der entwicklungsbiologischen Mitophagierate erkennbar ist. Während des Entwicklungszyklusses von *P. anserina* kommt es in diesem Altersstadium zu der Bildung der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane um die Sporen zur Vermehrung zu produzieren. In diesem Stadium spielt der Abbau von Mitochondrien eine scheinbar wichtige, aber noch nicht vollständig geklärte Rolle. Für diese Mitophagieinitiation scheint PaATG11 eine besondere Rolle zu spielen, möglicherweise ist auch hier die Funktion zur Rekrutierung der PaATG9-Vesikel elementar, um die basale Mitophagie zu erhöhen. Dies würde bedeuten, dass in der Zelle ein Ungleichgewicht von Lipiden vorliegt. Eine Untersuchung der Lipidverteilung der Zellen könnte daher Aufschluss geben, ob der Verlust von PaATG11 in dahingehend einen Einfluss hat.

4.3 PaATG11 ist bedeutend für die Morphologie und Funktion der Mitochondrien juveniler *P. anserina*-Stämme

Um einen Eindruck zu erhalten, wie sich die Einschränkung der Mitophagie auf die Mitochondrien in $\Delta PaAtg11$ auswirkt, wurden Untersuchungen zur Mitochondrienfunktionalität und Morphologie durchgeführt.

Für die Untersuchungen der Mitochondrienfunktion in $\Delta PaAtg11$ erfolgte eine Kultivierung des Stammes auf Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle. Dieses Substrat kann ausschließlich von funktionalen Mitochondrien verwertet werden und die Energieumwandlung erfolgt durch nicht-mitochondriale Atmungsprozesse (Camougrand et al. 2008). Während die Lebensspanne von $\Delta PaAtg11$ bei der Verwendung des M2-Mediums keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zeigt, kommt es bei der Kultivierung auf Glycerin-Medium jedoch zu einer deutlichen Verkürzung der Lebensspanne. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mitochondrienfunktion durch den PaATG11-Verlust stark beeinträchtigt ist. Untersuchungen in *S. cerevisiae* zur Kultivierung von $\Delta ScAtg11$ auf Glycerin-Medium zeigten, dass aufgrund des Kohlenstoffmangels eine Erhöhung der nicht-selektiven Autophagierate erfolgt (Adachi et al. 2017). Diese Autophagieinduktion erfolgt in Abhängigkeit der Gerüst-/Adapterproteine ScATG11 und ScATG17. Des Weiteren zeigten Adachi et al. (2017), dass die Glycerin-bedingte Erhöhung der Autophagierate direkt mit dem Sauerstoffverbrauch von *S. cerevisiae* korreliert. Die Autophagie-bedingte Aufrechterhaltung des intrazellulären ATP-Spiegels bei Kohlenstoffmangel ist elementar für das Überleben der Zellen. Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen in *S. cerevisiae* kann angenommen werden, dass bei einer Kultivierung von *P. anserina* auf Glycerin-Medium der Verlust von PaATG11 zu einem deutlichen Energiemangel führt und daher die Lebensspanne von $\Delta PaAtg11$ so stark verkürzt ist. Weitere Untersuchungen zum Energiemetabolismus in dieser Mutante könnten verifizieren, ob auch in $\Delta PaAtg11$ ein ATP-Mangel vorliegt und eine mögliche evolutionäre Konservierung dieser Mechanismen zeigen. Um einen genaueren Eindruck über die Mitochondrien in $\Delta PaAtg11$ zu erhalten, wurden eine mikroskopische Untersuchung dieser Organellen mit Hilfe des mitochondrialen Reporterstammes *PaSod3^{H26L}::Gfp* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die juvenilen *PaAtg11*-Deletionsstämme stark fragmentierte Mitochondrien aufweisen (Abbildung 19). Dieser untypische Phänotyp

für juvenile Mitochondrien ist möglicherweise der Hintergrund, weshalb die Kultivierung von $\Delta PaAtg11$ auf Glycerin-haltigem Medium zu der stark verkürzten Lebensspanne führt. Da bei der Anzucht der *PaAtg11*-Deletionsmutante auf Normalmedium keine Lebensspannenverkürzung vorliegt, war es möglich auch 14 und 21 Tage alte Stämme zu mikroskopieren. Diese zeigen zum Wildtyp vergleichbare Mitochondrien. Während bei 14 Tage alten Stämmen filamentöse Mitochondrien vorliegen, kommt es zu der bereits zuvor beschriebenen Alter-abhängigen Fragmentierung der Mitochondrien (Abbildung 19) (Scheckhuber et al. 2008). Es kann also angenommen werden, dass während der Alterung ein Prozess stattfindet, durch welchen der Verlust von PaATG11 kompensiert wird und dadurch aufgrund der späteren zum Wildtyp vergleichbaren Mitochondrienmorphologie die übliche Lebensspanne erreicht werden kann.

Um dies überprüfen zu können, wurde $\Delta PaAtg11$ auf M2-Minimalmedium angezogen und erst in einem Alter von 7 oder 14 Tagen auf M2-Medium mit Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle überführt. Dieser Versuchsaufbau zeigte, dass die Stämme, welche nach 7 Tagen auf Glycerin-Medium überführt wurden, nur noch eine leichte Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Bei den Stämmen, welche zunächst 14 Tage auf Normalmedium kultiviert wurden, war bei der Überführung auf Glycerin-haltiges Medium kein Unterschied zum Wildtyp mehr vorhanden. Somit zeigt sich, dass vor allem im juvenilen Stadium die Kohlenstoffquelle wichtig für die Lebensspanne der $\Delta PaAtg11$ ist und sehr wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Mitochondrienmorphologie und der verkürzten Lebensspanne besteht. Weiterführende Untersuchungen zur Vitalität der Mitochondrien und der Mitochondrienmenge in $\Delta PaAtg11$ könnten Aufschluss darüber geben, wie es zu der Fragmentierung und dem Funktionsverlust der Mitochondrien kommt.

4.4 PaATG24 ist mehr als ein putatives Mitophagierezeptorprotein

In Untersuchungen von He et al. (2013) wurde in *M. oryzae* gezeigt, dass der Verlust von MoATG24 dazu führt, dass ein Abbau von Mitochondrien in der Vakuole nicht mehr erfolgt. Eine Komplementation mit ScATG32 konnte diesen Phänotyp revertieren, sodass angenommen wurde, dass es sich bei ATG24 um ein Funktionshomolog von ScATG32 handelt. In dieser

Doktorarbeit wurde daher zunächst die Fragestellung untersucht, ob PaATG24 auch in *P. anserina* ein Funktionshomolog zu ScATG32 darstellen könnte.

Hierzu wurde in vorherigen Arbeiten eine *PaAtg24*-Deletionsmutante erstellt. Diese zeigt eine verkürzte Lebensspanne bei der Kultivierung auf M2-Normalmedium, sowie den für Autophagiemutanten typischen hellen Phänotyp (Abbildung 12). Des Weiteren kann eine Beeinträchtigung der Fertilität bei dieser Mutante festgestellt werden, welche auf eine verminderte Spermatienzahl zurückzuführen ist.

Um zu untersuchen, ob PaATG24 ein Funktionshomolog zu ScATG24 ist, wurde mit Hilfe der Reporterstämme *PaSod1::Gfp* und *PaSod3^{H26L}* die nicht-selektive Autophagie und die Mitophagie in $\Delta PaAtg24$ untersucht (Abbildung 13). Es kann festgestellt werden, dass durch die Deletion von *PaAtg24* keine nicht-selektive Autophagie in *P. anserina* feststellbar ist, unabhängig des untersuchten Altersstadiums. Aufgrund dieses Befundes kann davon ausgegangen werden, dass PaATG24 kein Funktionshomolog für ScATG32 darstellt, da nicht exklusiv die Mitophagie durch die *PaAtg24*-Deletion beeinträchtigt ist. Die Mitophagie ist in $\Delta PaAtg24$ reduziert, jedoch kann noch „freies GFP“ gemessen werden, welches im Laufe der Alterung des *PaAtg24*-Deletionsstammes ansteigt. Hierbei könnte es sich, ähnlich wie bei $\Delta PaAtg8$, um alternative Prozesse des Abbaus von Mitochondrien in der Vakuole handeln. Hierauf weist auch die Untersuchung zur Induktion der Mitophagie mit MMS in $\Delta PaAtg24$ hin, da im *PaAtg24*-Deletionsstamm eine Erhöhung des Abbaus des Reporterproteins möglich ist, obwohl die nicht-selektive Autophagie in dem Deletionsstamm beeinträchtigt ist. Die Daten zeigen, dass PaATG24 kein Funktionshomolog zu ScATG32 in *P. anserina* ist, da vor allem die nicht-selektive Autophagie durch die *PaAtg24*-Deletion beeinträchtigt ist. Es zeigten sich auch Auswirkungen der Deletion auf die Mitophagie, jedoch kommt es nicht zu einer vollständigen Inhibierung dieses Abbauweges. Neuere Untersuchungen haben zusätzlich gezeigt, dass der Verlust von PaATG24 zu einer Beeinträchtigung der Pexophagie und der ER-Phagie führt (Henkel et al. 2020; Schürmanns et al. 2022). Es wäre denkbar, dass die mitochondriale Abbaurate durch eine Integration von *ScAtg32* auch in $\Delta PaAtg24$ zu einer Erhöhung/Schein-Komplementation der Mitophagie führen würde, wie es bei He et al. (2013) in *M. oryzae* gezeigt werden konnte. Dabei ist allerdings von keiner Komplementation auszugehen, wie es bei einem Funktionshomolog der Fall wäre, sondern von der Aktivierung eines anderen Signalweges. Sofern eine Interaktion von

ScATG32 mit PaATG11 möglich ist, kommt es dadurch zur Rekrutierung des PAS und dem anschließenden Transport und Abbau der Mitochondrien. Dies geschieht dann aber unabhängig von dem fehlenden PaATG24. Es ist anzunehmen, dass es sich bei der Studie zu $\Delta MoAtg24$ um ein Artefakt handelt, das durch das Einbringen von ScATG32 auftrat.

In den Untersuchungen von *Atg24*-Deletionsstämmen in anderen Organismen wurde hauptsächlich der Verlust der selektiven Autophagie und der Einfluss auf den Proteintransport, zum Beispiel im Bereich des Retromer-Komplexes, betrachtet. Es fanden aber keine Funktionsuntersuchungen der jeweiligen Organellen statt, deren Abbau beeinträchtigt waren. Um einen tieferen Einblick in die Auswirkungen der *PaAtg24*-Deletion auf die Mitochondrien zu erhalten, erfolgte die Untersuchung der Mitochondrienfunktion und -morphologie in dem Deletionsstamm.

Die Untersuchung zur Mitochondrienfunktion von $\Delta PaAtg24$ erfolgte, wie zuvor für $\Delta PaAtg11$ beschrieben, mit Hilfe eines M2-Mediums mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Lebensspanne von $\Delta PaAtg24$ ist unter Normalbedingungen im Vergleich zum Wildtyp verkürzt und dies trat auch bei der Kultivierung mit Glycerin-Medium auf (Abbildung 12, 18). Aufgrund dieses vergleichbaren Ergebnisses ist es möglich, dass die Beeinträchtigung der Lebensspanne bei $\Delta PaAtg24$ auf einem eingeschränkten Abbau von geschädigten Mitochondrien zurück zu führen ist. Um feststellen zu können, ob ähnlich wie im *PaAtg11*-Deletionsstamm eine Veränderung der Mitochondrienmorphologie die Lebensspannenverkürzung verursacht, wurden die Mitochondrien von $\Delta PaAtg24$ mikroskopiert. Mit Hilfe des *PaSod3^{H26L}*-Reporterstammes konnte jedoch festgestellt werden, dass in 7 und 14 Tag alten Deletionsstämmen filamentöse Mitochondrien vorliegen und diese vergleichbar zum Wildtyp sind. Es sind keine morphologischen Veränderungen ersichtlich, welche die Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion verursachen (Abbildung 19).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass PaATG24 in *P. anserina* für die Aufrechterhaltung der nicht-selektiven Autophagie, sowie der Mitophagie benötigt wird und es sich nicht um ein reines Mitophagierezeptorprotein handelt. Die verringerte Mitophagierate der *PaAtg24*-Deletionsmutante hat keinen deutlichen Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie und es ist keine Akkumulation von Mitochondrien und mitochondrialen Proteinen feststellbar. Dennoch führt der Verlust von PaATG24 zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen

Funktion und Verkürzung der Lebensspanne.

4.5 Autophagie als ein Netzwerk von Proteininteraktionen

Für den Ablauf der Autophagie, beginnend mit der Initiation des PAS und anschließenden Umhüllung des geschädigten Mitochondriums mit dem Autophagosom, müssen die beteiligten Proteine und Lipide zur Verfügung stehen und in eine räumliche Nähe der Mitochondrien gebracht werden (Backues et al. 2015; He et al. 2006; Knuppertz und Osiewacz 2016; Mari et al. 2010; Matscheko et al. 2019; Ohashi und Munro 2010). Hierzu gibt es zelluläre Transportproteine, welche durch Interaktion mit dem Zytoskelett diesen Transport ermöglichen (Bean et al. 2017; van Weering et al. 2012a,b). Das zuvor beschriebene ATG24 ist in seiner Funktion als sortierendes Nexin ein solches Protein. Durch den Aufbau der BAR/PX-Domänenstruktur ist es in der Lage mit Proteinen und Membranen zu interagieren und eine Beteiligung am endosomalen Sortiervorgang durch eine Interaktion mit Dynamin konnte in *H. sapiens* gezeigt werden (Haft et al. 1998; Ma et al. 2018; Traer et al. 2007; van Weering et al. 2012a,b). In verschiedenen Organismen ist ATG24 an der Verteilung von SNARE-Proteinen beteiligt, aber, wie neueste Befunde in *S. cerevisiae* zeigen, ist ScATG24 auch wichtig für die Rückgewinnung von ScATG27 aus der vakuolären Membran, ein Protein welches wiederum die Lokalisation von ScATG9 koordiniert (Best et al. 2020; Hettema et al. 2003; Kama et al. 2007; Ma und Burd 2019; Ma et al. 2017, 2018; Zheng et al. 2018). Neueste Untersuchungen zeigen, dass ScATG24 auch mit ScATG9A-positiven Membranen co-lokalisiert und direkt an dem Recycling von ATG9-Vesikeln beteiligt ist (Antón et al. 2020; Ravussin et al. 2021). ScATG24 erhält die Autophagie aufrecht, indem es die Erschöpfung des verfügbaren ATG9A-Pools verhindert (Ravussin et al. 2021). Für die Initiation der Autophagosomenbildung muss zunächst eine Rekrutierung der ATG9-Vesikel stattfinden, welche die Membranen für die Autophagosomen liefern (Reggiori et al. 2004; Shintani und Klionsky 2004). Diese Rekrutierung erfolgt durch die Gerüstproteine ScATG11 oder ScATG17, welche jedoch um die Beteiligung am ScATG1-Komplex konkurrieren (Matscheko et al. 2019). Dabei führt ScATG11 zur selektiven Autophagie, während ScATG17 für die nicht-selektive Autophagie benötigt wird (Kim et al. 2001; Shintani und Klionsky 2004). ATG11 und ATG24 sind somit

in aufeinanderfolgenden Prozessen beim Auf- und Abbau des ATG9-Pools beschrieben. Die beiden Proteine haben auch weitere nicht zusammenhängende Funktionen in unterschiedlichen Prozessen der Autophagie, wie dem Retromer-Komplex bei ATG24 und der PAS-Rekrutierung von ATG11. Interessanterweise ist in *S. cerevisiae* für ScATG11 und ScATG24 eine Interaktion mit ScATG20 beschrieben, welches auch ein sortierendes Nexin darstellt (Nice et al. 2002; Yorimitsu und Klionsky 2005). Es handelt sich hierbei vermutlich um Interaktionen im Bereich des ATG1-Komplexes, bei welchem ScATG20 lokalisiert ist (Popelka et al. 2017). Eine direkte Interaktion von ATG11 und ATG24 wurde bisher in keinem Organismus gezeigt.

Um den Zusammenhang dieser beiden Proteine zu untersuchen, erfolgte die Erstellung einer $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ -Doppelmutante. Mit Hilfe dieses Stammes ist es möglich zu untersuchen, ob die festgestellten Einschränkungen der Mitochondrienfunktion der Einzelstämme durch unterschiedliche Prozesse hervorgerufen wird, oder ob die beiden Proteine in gleichen Signalwegen involviert sind. Zunächst erfolgte die Kultivierung der *PaAtg11/PaAtg24*-Doppelmutante auf M2-Medium zur Bestimmung der Lebensspanne bei Normalbedingungen. Dabei zeigt sich, wie schädlich der Verlust dieser beiden Proteine für *P. anserina* ist. (Abbildung 17). Die Lebensspanne von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ beträgt nur noch die Hälfte der Lebensspanne des Wildtyps. Unter Normalbedingungen führt der Verlust der beiden Proteine somit zu additiven Effekten, wodurch die stark verkürzte Lebensspanne auftritt. Es kann somit angenommen, dass die Autophagieproteine PaATG11 und PaATG24 auch in *P. anserina* teilweise an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind, wie es bei *S. cerevisiae* für den Retromer-Komplex und die PAS-Rekrutierung gezeigt wurde. Die Betrachtung der Mitochondrienfunktion durch Kultivierung auf M2-Medium mit Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle zeigt jedoch, dass die Doppelmutante eine im Vergleich zu $\Delta PaAtg11$ verlängerte Lebensspanne besitzt. Hier scheint der Verlust von PaATG24 einen positiven Effekt zu haben und im juvenilen Stadium von Vorteil für die Mitochondrienfunktion zu sein. Aufgrund der in *S. cerevisiae* gewonnenen Erkenntnisse, kann zum einen die ATG24-ATG20-ATG11 Interaktion einen Einfluss auf die Mitochondrienfunktion haben, aber auch der Auf- und Abbau des PaATG9-Pools durch die Doppeldeletion wieder ins Gleichgewicht gekommen sein. Eine Untersuchung von PaATG9 könnte Aufschluss liefern, ob sich der Lipidpool in der Doppelmutante anders verhält, als in den Einzelstämmen.

Die eingeschränkte Mitochondrienfunktion des *PaAtg11*-Deletionsstammes war mit den stark fragmentierten Mitochondrien im juvenilen Stadium assoziiert. Bei einer Betrachtung der Mitochondrienmorphologie zeigt sich, dass $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ im juvenilen Stadium filamentöse Mitochondrien besitzt, wodurch es scheinbar zu der verbesserten Mitochondrienfunktion der Doppelmutante im Vergleich zum *PaAtg11*-Deletionsstamm kommt. Diese Untersuchungen sind jedoch als initial zu betrachten, da eine Erhöhung der Stichprobenzahl für eine ausreichende Evidenz der Befunde nötig wäre. Durch Interaktionsstudien von PaATG11 und PaATG24 könnte untersucht werden, inwiefern die beiden Proteine an der Mitochondrienfunktion involviert sind und durch welche Prozesse die juvenile Fragmentierung $\Delta PaAtg11$ durch den zusätzlichen Verlust von PaATG24 verhindert wird. Vor allem eine Untersuchung zum PaATG9-Pool in den Einzelstämmen im Vergleich zur Doppeldelation kann neue Erkenntnisse zu dem Netzwerk der Proteininteraktionen liefern, welche wichtig für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Fitness und der Autophagie sind.

4.6 Der Verlust von PaATG24 führt zu einer Akkumulationen von Autophagosomen

Während bei PaATG11 die Beeinträchtigung der Autophagie und Mitophagie einen Einfluss auf die Mitochondrien des Deletionsstammes hat, zeigte der Verlust von PaATG24 keinen solchen Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass PaATG24 kein Mitophagierezeptorprotein ist, da neben der Mitophagie auch die nicht-selektive Autophagie im Deletionsstamm beeinträchtigt war. Daher war die Funktion dieses Proteins in der Autophagie von *P. anserina* weiterhin ungeklärt. Um einen Eindruck zu erhalten, welchen Effekt die *PaAtg24*-Deletion auf den autophagischen Prozess hat, wurde die *PaAtg8*-Expression in diesem Stamm untersucht, da *PaAtg8* für das zentrale Protein der Autophagosomenbildung kodiert. In vorherigen Arbeiten zu *T. brucei*, einem humanen Pathogen, wurde gezeigt, dass der Verlust von TbATG24 zu einer Autophagosomenakkumulation führt (Brennan et al. 2015). Auch in *S. cerevisiae* kann in $\Delta ScAtg24$ eine Autophagosomenakkumulation festgestellt werden, jedoch zeigt diese Mutante keine verringerte nicht-selektive Autophagie. Erst in Kombination mit einer *Cog8*-Deletion, ein Gen, das für eine Komponente des Golgi-Apparates codiert, kommt es zu einer Beeinträchtigung

(Ohashi und Munro 2010). Im juvenilen Altersstadium kommt es in $\Delta PaAtg24$ zu einer deutlichen Erhöhung der *PaAtg8*-Expression (Abbildung 22). Dies scheint im ersten Moment ungewöhnlich, da zuvor festgestellt wurde, dass die nicht-selektive Autophagie in diesem Stamm beeinträchtigt ist. Möglicherweise bedeutet diese Hochregulation, dass der autophagische Fluss beeinträchtigt ist und durch eine Erhöhung der *PaAtg8*-Expression soll dieser Defekt kompensiert werden. Während die Proteinmenge von PaATG8 in $\Delta PaAtg24$ bei der Alterung von 7 zu 14 Tagen gleich bleibt, sinkt die *PaAtg8*-Expression im Deletionsstamm statistisch signifikant ab. Falls die Regulation der *PaAtg8*-Expression über eine Sättigung der Proteinmenge erfolgt, spricht dieses Ergebnis dafür, dass kein Abbau des gebildeten PaATG8-Proteins in der Vakuole stattfindet, sondern eine negative Rückkopplung erfolgt. Hierfür spricht auch das Ergebnis der *PaAtg8*-Expression im Vergleich zur PaATG8-Proteinmenge im Wildtyp. Während die Expression in beiden betrachteten Altersstadien gleichbleibend ist, liegt bei 14 Tage alten Stämmen deutlich weniger PaATG8 in der Zelle vor als im juvenilen Altersstadium. Dabei muss beachtet werden, dass es während der Alterung von *P. anserina* zu einem Anstieg der Autophagosomenzahl und einer Steigerung des autophagischen Flusses kommt (Knuppertz et al. 2014). Dadurch wird PaATG8 vermehrt in die Vakuole transportiert und abgebaut, wodurch die PaATG8-Menge in der Zelle verringert wird. In $\Delta PaAtg24$ ist ein solcher Abbau von PaATG8 nicht erkennbar, stattdessen bleibt die Proteinmenge während der Alterung stabil. Dies ist ein Hinweis, dass der Transport und Abbau von PaATG8 und somit auch von Autophagosomen durch den Verlust von PaATG24 beeinträchtigt ist. Um festzustellen, ob überhaupt ein Abbau von PaATG8 in den Vakuolen von $\Delta PaAtg24$ stattfinden kann, wurde mit Hilfe einer Western Blot-Analyse der Abbau des GFP::*PaATG8*-Reporterproteins untersucht. Dabei zeigt sich, dass grundsätzlich PaATG8 in die Vakuole gelangen kann, wo der Abbau dieses Fusionsproteins erfolgt (Abbildung 22). In beiden betrachteten Altersstadien wird allerdings eine statistisch signifikant geringere Menge des Autophagosomen-Proteins abgebaut als im Kontrollstamm. Dies zeigt, dass der autophagische Fluss in der Deletionsmutante nicht komplett zum Erliegen kommt, aber die vorhandene Reduktion bereits ausreicht, um die nicht-selektive und selektive Autophagie in $\Delta PaAtg24$ nachhaltig zu schädigen. Die Beeinträchtigung der Autophagie kann sowohl an einem Fusionsdefekt der Autophagosomen mit Vakuole liegen, aber auch an einer gestörten Autophagosomenbildung. Um einen Eindruck der Autophagosomenzahl in

$\Delta PaAtg24$ zu erhalten, erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit Hilfe des *Gfp::PaAtg8*-Reporterstamms. Bei der Untersuchung von $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ zeigt sich, dass auch ohne PaATG24 weiterhin die Bildung von Autophagosomen möglich ist (Abbildung 23). Somit ist PaATG24 nicht direkt an der initialen Bildung von Autophagosomen beteiligt. Stattdessen führt der Verlust von PaATG24 zu einer statistisch signifikanten und relevanten Akkumulation von Autophagosomen. Somit ist PaATG24 wichtig für die Aufrechterhaltung des autophagischen Flusses in *P. anserina*. Dies wurde ebenso in *T. brucei* gezeigt, während in *S. cerevisiae* erst durch eine zusätzliche Deletion von *ScCog8* eine Akkumulation von Autophagosomen erfolgte. Es handelt sich also beim autophagischen Fluss um einen partiell konservierten Mechanismus zwischen den Spezies, der offenbar auch von der Zusammensetzung der Organellen der verschiedenen Organismen abhängt. Da in *P. anserina* durch den Verlust von PaATG24 eine Beeinträchtigung des Abbaus von *Gfp::PaAtg8* in der Vakuole vorliegt, ist dem Anschein nach die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion der Flaschenhals des autophagischen Flusses in $\Delta PaAtg24$.

4.7 Die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion erfolgt

PaATG24-unabhängig

In der vorherigen Untersuchung wurde gezeigt, dass eine Bildung von Autophagosomen auch bei Verlust von PaATG24 erfolgt und auch PaATG8 in die Vakuole gelangt. Dennoch tritt ein Autophagiedefekt in $\Delta PaAtg24$ auf. Um einen besseren Eindruck von PaATG24 zu erhalten, wurde die Lokalisation von PaATG24 analysiert. Die Betrachtung der Lokalisation von PaATG24 zeigt, dass dieses sortierende Nexin in punktförmigen Strukturen in der Nähe von Vakuolen lokalisiert ist (Abbildung 26). Hier ist ein Unterschied zu SpATG24 in *S. pombe* festzustellen. SpATG24 befindet sich unter Normalbedingungen als punktförmige Strukturen in der Zelle verteilt, während es bei Mangelbedingungen zu einer Akkumulation am PAS kommt (Zhao et al. 2016). Hier kommt möglicherweise die Interaktion von ATG24 mit ATG20 oder mit ATG9 zum Tragen, wodurch ATG24 aufgrund dieser beschriebenen Proteininteraktionen am ATG1-Komplex des PAS beteiligt ist, wie es auch für *S. cerevisiae* beschrieben ist (Nice et al. 2002; Ohashi und Munro 2010; Popelka et al. 2018). Auch die Untersuchungen zur

$\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ -Doppelmutante weisen darauf hin, dass $\Delta PaAtg24$ ebenfalls im Bereich des PAS eine weitere Funktion besitzen könnte. Unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen, welche zur PaATG24-Lokalisation verwendet wurden, ist dieses sortierende Nexin jedoch hauptsächlich in der Nähe von Vakuolen zu finden. Diese Lokalisation entspricht auch der in *P. pastoris* beschriebenen Funktion bei der Mikropexophagie (Ano et al. 2005). Durch die Untersuchung der PaATG24-Lokalisation bei unterschiedlichen Kulturbedingungen könnten weitere Informationen über die Beteiligung von PaATG24 an den verschiedenen autophagischen Prozessen bringen. Auch Co-Lokalisationsstudien mit Proteinen, welche dem PAS, oder der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion zugeordnet werden, sind Ansätze, um die Aufgabenbereiche von PaATG24 besser verstehen zu können. Grundsätzlich scheint die Lokalisation des sortierenden Nexins ATG24 dynamisch zu sein und in Abhängigkeit der zellulären Situation reguliert zu werden.

Da PaATG24 in *P. anserina* in punktförmigen Strukturen bei der Vakuole lokalisiert ist und es zu einer Autophagosomenakkumulation $\Delta PaAtg24$ kommt, liegt die Vermutung nahe, dass in diesem Fall das sortierende Nexin bei der Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole beteiligt ist. Die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion stellt einen komplexen Mechanismus dar und wird durch SNARE-Proteine vermittelt. Dabei muss zunächst das Autophagosom in räumliche Nähe zur Vakuole gebracht werden und anschließend wird die Verknüpfung der autophagosomalen und vakuolären SNARE-Proteine die Fusionsreaktion eingeleitet (Nakatogawa 2020). SNARE-Proteine sind in der Zelle bei vielfältigen Membranfusionen beteiligt. Es handelt sich bei dem Transport der SNARE-Proteine um einen strikt regulierten Prozess, damit die gleichmäßige Zusammensetzung der einzelnen Organellen nicht beeinträchtigt wird (Bonifacino und Glick 2004). SNARE-Proteine sind nicht nur bei der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion beteiligt, sondern auch bekannt für ihre Funktion bei der Exozytose zur Freisetzung von zellulären Bestandteilen in die Umgebung eines Organismus. Bei dem pflanzenpathogenen Pilz *F. graminearum* konnte gezeigt werden, dass die SNC1-vermittelte Exocytose wichtig für die Infiltration der Hyphen und den Befall der Wirtspflanze ist (Zheng et al. 2018). An dem Transport von FgSNC1 ist FgATG24 beteiligt und eine *FgAtg24*-Deletionsmutante führt zu einer deutliche verringerten Infektiosität des Stammes. In $\Delta FgAtg24$ wurde jedoch nur die Auswirkung des FgATG24-Verlustes auf das an der Exozytose

beteiligte SNARE-Protein FgSNC1 analysiert, aber es erfolgte keine Untersuchung zu einer möglichen Fehllokalisierung anderer SNARE-Proteine. Auch Untersuchungen zur Auswirkung des Verlustes von FgATG24 auf die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion liegen nicht vor. Aufgrund der Vakuolenlokalisierung von PaATG24 ist in *P. anserina* eine Beteiligung dieses sortierenden Nexins bei der Koordination der vakuolären SNARE-Proteine naheliegend. Wenn dies der Fall ist, wäre die Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole beeinträchtigt und es kann zu der festgestellten Autophagosomenakkumulationen kommen. Hierfür sprechen auch neuere Untersuchungen in *P. anserina*, welche gezeigt haben, dass auch in diesem Pilz der Verlust von PaATG24 zu einer Fehllokalisierung von PaSNC1 unter Normalbedingungen führt (Schürmanns et al. 2022). Bei Kultivierung auf Oleat-haltigem Medium erfolgt jedoch eine Wildtyp-ähnliche Lokalisation von PaSNC1 in $\Delta PaAtg24$ (Schürmanns et al. 2022). Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigen, dass die Vakuolen in $\Delta ScAtg24$ Fusions-kompetent sind und der Transport von Hydrolasen in die Vakuole möglich ist (Ohashi und Munro 2010). Der Transport von Hydrolasen in die Vakuole erfolgt mittels des cvt-Signalweges, welcher einen spezifischen Autophagieweg für *S. cerevisiae* darstellt (Suzuki et al. 2002). Andere Untersuchungen in diesem Organismus zeigten jedoch, dass bei der Betrachtung der Nucleophagie eine verringerte Intensität des GFP-Reporterproteins in der Vakuole in $\Delta ScAtg24$ -Zellen vorliegt (Nemec et al. 2017). Für eine genauere Analyse der Autophagosomen-Vakuolen-Fusion wurde daher mit Hilfe des *Gfp::PaAtg8*-Stammes die Lokalisation des GFP-Proteins in der Wildtypkontrolle und im *PaAtg24*-Deletionsstamm untersucht.

Zur Untersuchung der Fusionskompetenz von $\Delta PaAtg24$ erfolgte eine Kultivierung der Stämme auf Stickstoffmangelmedium zur Autophagieinduktion und Vakuolenbildung. Die mikroskopische Untersuchung zur Lokalisation des GFP-gekoppelten PaATG8 zeigte, dass auch im *PaAtg24*-Deletionsstamm unter Autophagiebedingungen ein Transport von Autophagosomen in die Vakuole vorhanden ist (Abbildung 25). Die Quantifizierung der GFP-Intensität innerhalb der Vakuolen von $\Delta PaAtg24$ und der Wildstammkontrolle im Verhältnis zur GFP-Intensität der Hyphen zeigt, dass kein Unterschied zwischen den Stämmen vorliegt. Somit ist die Vakuole in $\Delta PaAtg24$ Fusions-kompetent, wie es auch bei *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte. Obwohl PaATG24 scheinbar keinen Einfluss auf die Lokalisation und Funktion von vakuolären SNARE-Proteinen hat, ist es dennoch möglich, dass dieses sortierende Nexin wie in

F. graminearum an der Lokalisation von SNARE-Proteinen der Exocytose beteiligt ist. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion in *P. anserina* unabhängig von PaATG24 ist.

4.8 Das sortierende Nexin PaATG24 koordiniert die Größe und Morphologie der Vakuolen von *P. anserina*

Obwohl die Vakuole in $\Delta PaAtg24$ Fusions-kompetent ist, kommt es zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Autophagie in diesem Stamm und einer Akkumulation von Autophagosomen. Während der mikroskopischen Untersuchung zur Autophagosomen-Vakuolen-Fusion zeigte sich, dass die Vakuolen im *PaAtg24*-Deletionsstamm eine ungewöhnliche Form aufwiesen und scheinbar mehr Vakuolen in diesem Stamm auftraten. Die Lokalisation von PaATG24 wurde im Bereich der Vakuolen festgestellt, ebenso zeigen Untersuchungen in *P. pastoris*, dass bei diesem Organismus eine direkte Interaktion von PpATG24 mit der Vakuolenmembran vorliegt (Ano et al. 2005). In *P. pastoris* wurde gezeigt, dass PpATG24 an der Mikropexophagie beteiligt ist und die Ausbildung der MIPA-Struktur bewirkt, der vakuolären Ausstülpung zur mikroautophagischen Aufnahme eines Peroxisoms in die Vakuole, in welcher anschließend der Abbau dieses Organells stattfindet. Auch bei den Untersuchungen in *S. cerevisiae* zur Funktion von ScATG24 im Retromer-Komplex konnte eine Assoziation von ScATG24 zur Vakuole festgestellt werden (Ma et al. 2018). Um untersuchen zu können, inwiefern PaATG24 in *P. anserina* einen Einfluss auf die Vakuolen hat, wurde eine umfangreiche mikroskopische Analyse der Vakuolen im Deletionsstamm und im Wildtyp durchgeführt. Bisher wurde in keinem anderen Organismus eine morphologische Veränderung der Vakuole nur durch den Verlust von ATG24 gezeigt. Eine Untersuchung von Ma et al. (2018) zeigte, dass es nur durch den zusätzlichen Verlust von ScPSD1, einer Phosphatidylserindecaboxylase der inneren Mitochondrienmembran, zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung der Vakuolenmembran führt, welche eine Fragmentierung auslöst. Um die Vakuolenveränderung in $\Delta PaAtg24$ untersuchen zu können, wurde, wie bei der vorherigen Analyse, eine Kultivierung auf Stickstoffmangelmedium durchgeführt, wodurch die Bildung von Vakuolen initiiert wurde (Abbildung 26). Es zeigt sich, dass der Verlust

von PaATG24 zu sehr runden, fast Knopf-förmigen Vakuolen führt, während im Wildtyp die typischen ovalen Vakuolen vorliegen. Bei der Untersuchung der Vakuolenfläche im Verhältnis zur Hyphenfläche kann festgestellt werden, dass in $\Delta PaAtg24$ sowohl in 7, als auch in 14 Tage alten Stämmen eine signifikant verringerte Vakuolenfläche vorhanden ist. Diese Reduktion der Vakuolenfläche führt vermutlich zu den zuvor dargestellten Autophagiedefekten. Da der Verlust von PaATG24 eine verringerte Vakuolenfläche verursacht, kann deutlich weniger zelluläres Material in der Vakuole aufgenommen und recycelt werden. Es ist anzunehmen, dass es dadurch zu der beobachteten Akkumulation der Autophagosomen kommt und der autophagosomale Fluss in $\Delta PaATG24$ zum Erliegen kommt. Die Analyse der Vakuolengröße zeigt, dass insgesamt deutlich mehr kleine Vakuolen in $\Delta PaAtg24$ vorliegen, vor allem in den 7 Tage alten Stämmen. Während der Alterung kommt es in *P. anserina* zu einem Anstieg der Vakuolenfläche, ebenso, wie in vorherigen Untersuchungen ein Anstieg der Autophagie während der Alterung dieses Pilzes beobachtet werden konnte. Dies ist nachvollziehbar, da sich während der Alterung die zellulären Schäden häufen und somit mehr Proteine und Zellbestandteile abgebaut werden. Dennoch ist der Anteil der Vakuolenfläche in der Hyphe in $\Delta PaAtg24$ geringer als es typisch für dieses Altersstadium ist. Durch die Beeinträchtigung der Vakuolenmorphologie in $\Delta PaAtg24$ ist der normale autophagosomale Fluss gestört und der Abbau von geschädigten Proteinen und Organellen in der Vakuole nur eingeschränkt vorhanden.

Bei den Untersuchungen zu $\Delta ScAtg24/ScPsd1$ wurde als Ursache des Autophagieverlustes eine gestörte Lipidverteilung der Vakuolenmembran festgestellt werden. In der Vakuolenmembran befindet sich Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin. Durch den Verlust der beiden Proteine kommt es zu einer Verschiebung des Lipidverhältnisses, welches in einer verminderten Kompetenz der Vakuole resultiert. In dieser Doppelmutante trat eine erhöhte Anzahl von Vakuolen auf, ähnlich wie es für $\Delta PaAtg24$ festgestellt wurde. Auch die Verschiebung der Vakuolengröße hin zu kleineren Vakuolen ist sowohl in der *S. cerevisiae*-Doppelmutante, als auch in der *PaAtg24*-Deletionsmutante vorhanden. Allerdings verursacht in *P. anserina* bereits der alleinige Verlust von PaATG24 die Veränderungen der Vakuolen. In *S. cerevisiae* zeigen auch neueste Untersuchungen, dass ScATG24 bedeutend für die Rückgewinnung von ScATG9 aus der Vakuole ist (Ravussin et al. 2021). Wie bereits zuvor dargestellt, sind ScATG9-Vesikel die Membranlieferanten zur Bildung der Autophagosomen. Es ist gut möglich, dass es zu

einem Lipid-Missverhältnis in der vakuolären Membran kommt, wenn die ScATG24-vermittelte Rückgewinnung von ScATG9 nicht erfolgen kann. Dafür sprechen auch neuste Analysen in *P. anserina*, die im Anschluss an diese Doktorarbeit erstellt wurden (Schürmanns et al. 2022). Dabei wurde bestätigt, dass es in $\Delta PaAtg24$ die Membranverteilung innerhalb der Hyphen beeinträchtigt ist, was wiederum durch die Zugabe von Oleat ins Medium revertiert werden kann (Schürmanns et al. 2022). Um die zugrundeliegenden Ursachen für die Beeinträchtigung der Lipidverteilung im *PaAtg24*-Deletionsstamm zu identifizieren könnten Untersuchungen des Lipid-Verhältnisses in $\Delta PaAtg24$ Aufschluss geben, sowie Untersuchungen von PaATG9 in *P. anserina* und eine denkbare Interaktion von PaATG9 und PaATG24.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass PaATG24 einen erheblichen Einfluss auf die Autophagie und die damit verbundenen Prozesse hat. Die Vakuole spielt eine zentrale Rolle bei dem Ablauf des autophagischen Abbaus und Recyclings von zellulären Proteinen und Organellen. Wie in Abbildung 28 dargestellt, liegt in $\Delta PaAtg24$ ein Defekt der nicht-selektiven Autophagie vor.

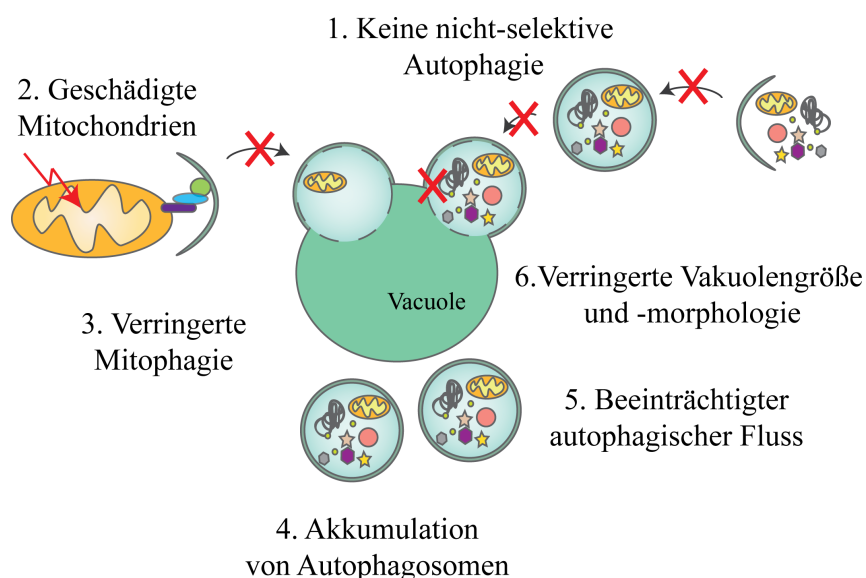


Abbildung 28: Auswirkung des Verlusts von PaATG24 in *P. anserina*.

Der Verlust von PaATG24 führt zu einem Defekt der nicht-selektiven Autophagie (1.). Die Mitochondrien in $\Delta PaAtg24$ sind beeinträchtigt (2.) und es liegt eine reduzierte Mitophagierate (3.) in dem Deletionsstamm vor. Es kommt zu einer Akkumulation von Autophagosomen (4.) und generell einer Beeinträchtigung des autophagosomalen Flusses (5.). Die Ursache hierfür ist die veränderte Vakuolengröße und Morphologie (6.) im *PaAtg24*-Deletionsstamm.

Die Funktionalität der Mitochondrien ist in diesem Stamm eingeschränkt und es kommt zu einer verminderten Mitophagie. Es kommt zu einer Akkumulation von Autophagosomen in dem *PaAtg24*-Deletionsstamm, aufgrund des gestörten autophagosomalen Flusses. Die in dieser Doktorarbeit dargestellten Untersuchungen zeigen, dass die Morphologie und die Vakuolengröße

von PaATG24 abhängen und die Vakuole einen bedeutenden Einfluss auf den autophagischen Fluss und die damit verbundenen Prozesse bis hin zur Lebensspanne von *P. anserina* besitzt.

Ausblick

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Rolle von den Autophagie-assoziierten Proteinen PaATG8, PaATG11 und PaATG24 in dem filamentösen Ascomyceten *P. anserina* im Bezug zur der Alterung dieses Pilzes untersucht. Durch $\Delta PaAtg8$ konnte gezeigt werden, dass in *P. anserina* ein Autophagosomen-unabhängiger Abbauweg von mitochondrialen Proteinen zur Degradation in der Vakuole existiert. Eine Untersuchung der Mitochondrienfunktion könnte Hinweise darauf geben, welchen Einfluss der Verlust der Autophagosomenbildung auf diese Organellen hat. Die Rolle der Mikromitophagie ist weitestgehend unbekannt und auch zu MDVs sind noch viele Fragen offen. Mit Hilfe des *PaAtg8*-Deletionsstammes ist es möglich, diese Mechanismen tiefergehend zu untersuchen. Auch der Abbau weiterer Organellen durch Mikroautophagie ist bisher wenig untersucht. Erkenntnisse aus *P. pastoris* zeigen, dass in diesem Stamm Mikropexophagie stattfindet (Ano et al. 2005). Durch den in *P. anserina* etablierten Peroxisomen-Reporterstamm *mCherry-SKL* kann die Mikropexophagie in $\Delta PaAtg8$ analysiert werden (Henkel et al. 2020; Schürmanns 2017).

Während für die meisten Organismen die nicht-selektiven Autophagie bei Verlust von ATG11 nicht beeinträchtigt ist, zeigen die Ergebnisse in $\Delta PaAtg11$ eine Verringerung der Autophagierate. Durch eine Untersuchung der Autophagosomen im *PaAtg11*-Deletionsstamm wäre es möglich, sich der Ursache des Defizits der nicht-selektiven Autophagie zu nähern.

Die Untersuchung der Mitochondrien in $\Delta PaAtg11$ hat gezeigt, dass die Funktionalität im juvenilen Stadium stark beeinträchtigt ist und die Mitochondrien fragmentiert vorliegen. Durch weitere Funktionsuntersuchungen der Mitochondrien wäre es möglich zu zeigen, ob die Veränderungen während der Alterung des *PaAtg11*-Deletionsstammes im Zusammenhang mit einer gesteigerten Atmung und ATP-Synthese stehen.

Die Untersuchungen zeigen, dass in $\Delta PaAtg11$ das Kulturmedium entscheidend für die Aufrechterhaltung der Lebensspanne ist. Daher wären Untersuchungen bei verschiedenen Kulturbedingungen sinnvoll. In einer vorherigen Masterarbeit in der Arbeitsgruppe wurde dargestellt, dass die Anzucht auf Oleat-Medium zu einem Anstieg der Peroxisomenzahl führt und auch den Wuchsdefekt von $\Delta PaAtg24$ kompensiert (Schürmanns 2017). Mit Hilfe dieses Mediums könnte der Einfluss des PaATG11-Verlustes auf die Peroxisomen untersucht werden. Auch die Anzucht der $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ -Doppelmutante auf diesem Medium wäre

aufschlussreich, um weitere Hinweise auf den Zusammenhang von PaATG11 und PaATG24 zu erhalten. Falls der Zusammenhang von PaATG11 und PaATG24 in der Aufrechterhaltung des PaATG9-Pools besteht, wär es durch die Erstellung eines PaATG9::GFP-Stammes möglich zu untersuchen, wie sich der ATG9-Pool in der Doppelmutante und den beiden Einzelstämmen verhält. In *S. cerevisiae* ist beschrieben, dass der Verlust von ScATG11 zu einem Lipidmangel im Bereich der Autophagosomenbildung führt (He et al. 2006). Eine Untersuchung des Lipid-Verhältnisses in den Autophagie-Deletionsstämmen wäre daher sinnvoll. Sowohl in $\Delta PaAtg11$, der Doppelmuntante, aber auch in $\Delta PaAtg24$. Denn in *S. cerevisiae* wurde im Stamm $\Delta ScSnx4/\Delta Psd1$ gezeigt, dass der Verlust dieser beiden Proteine zu einem fehlerhaften Lipid-Verhältnis führt und ein Ungleichgewicht zwischen Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin zu einer Fragmentierung der Vakuolen führt. Um ein tiefergehendes Verständnis zur Funktion von PaATG24 im Bereich der Lipide und der Vakuole von *P. anserina* zu erhalten, wäre es sinnvoll den PaATG24::GFP-Stamm nach Kultivierung auf unterschiedlichen Medien zu mikroskopieren. Auch Co-Lokalisationsstudien mit zum Beispiel einem PaATG9::GFP-Stamm würden helfen die verschiedenen Aufgabenbereiche von PaATG24 zu identifizieren.

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Funktion und die Rolle von Autophagie-assoziierten Proteinen im Alternsmodell *P. anserina* zu untersuchen und einen Einblick in die nicht-selektive Autophagie, die Mitophagie und die Bildung und den Abbau von Autophagosomen im Zusammenhang zur Alterung von *P. anserina* zu analysieren. Dabei wurden folgende Erkenntnisse erhalten:

1. Die Untersuchungen zu $\Delta PaAtg8$ bestätigen, dass die PaATG8-abhängige Autophagosomenbildung zur Aufrechterhaltung der Lebensspanne benötigt wird. In $\Delta PaAtg8$ kommt es zu einem Verlust der nicht-selektiven Autophagie. Die Mitophagie hingegen ist auch ohne PaATG8 partiell möglich und es liegt ein PaATG8-unabhängiger Abbau von mitochondrialen Proteinen in *P. anserina* vor.
2. In *P. anserina* ist PaATG11 an der nicht-selektiven Autophagie beteiligt und auch die Mitophagie erfolgt in Abhängigkeit dieses Gerüstproteins. Während der *PaAtg11*-Deletionsstamm unter Normalbedingungen keinen zum Wildtyp veränderten Phänotyp zeigt, führt eine Kultivierung auf M2-Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle zu einer starken Verkürzung der Lebensspanne. Eine mikroskopische Untersuchung der Mitochondrien zeigte, dass im juvenilen Altersstadium von $\Delta PaAtg11$ stark fragmentierte Mitochondrien vorliegen. Während der Alterung normalisiert sich die Mitochondrienmorphologie wieder. Der mitochondriale Funktionsverlust wird möglicherweise von den fragmentierten Mitochondrien ausgelöst, denn eine Kultivierung von älteren $\Delta PaAtg11$ -Stämmen auf M2-Medium mit Glycerin führt zu einer Normalisierung der Lebensspanne.
3. Die initialen Untersuchungen zur $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ -Doppelmutante zeigen, dass es bei der Kultivierung unter Normalbedingungen zu einem additiven Effekt der beiden Genverluste kommt. Bei der Anzucht auf M2-Medium mit Glycerin hingegen kann eine im Vergleich zum $\Delta PaAtg11$ -Stamm längere Lebensspanne festgestellt werden. Die Mikroskopie der Mitochondrien in $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ zeigt, dass im juvenilen Alter zum Wildtyp vergleichbare filamentöse Mitochondrien vorhanden sind.

4. In *P. anserina* ist PaATG24 kein Mitophagierezeptorprotein, da im *PaAtg24*-Deletionsstamm eine Beeinträchtigung der nicht-selektiven Autophagie vorliegt. Auch die Mitophagie ist in diesem Stamm geschädigt. Die mikroskopische Betrachtung der Mitochondrien zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp. Bei der Untersuchung zur Mitochondrienfunktion durch M2-Medium mit Glycerin ist wie unter Normalbedingungen eine verkürzte Lebensspanne feststellbar.
5. Der Abbau von GFP::PaATG8 ist in der *PaAtg24*-Deletionsmutante signifikant verringert und es kommt zu einer Akkumulation von Autophagosomen, somit liegt in diesem Stamm eine Beeinträchtigung des autophagosomalen Flusses vor. Bei der mikroskopischen Untersuchung von PaATG24 zeigt sich, dass dieses Protein in *P. anserina* im Bereich der Vakuolen lokalisiert ist. Die Analyse der Vakuole-Autophagosomen-Fusion zeigt jedoch, dass dieser Mechanismus unabhängig von PaATG24 ist. Die Vakuolenmorphologie und Vakuolengröße ist in $\Delta PaAtg24$ beeinträchtigt und dadurch kommt es zu dem beobachteten Defekt der nicht-selektiven und selektiven Autophagie.

Anhang

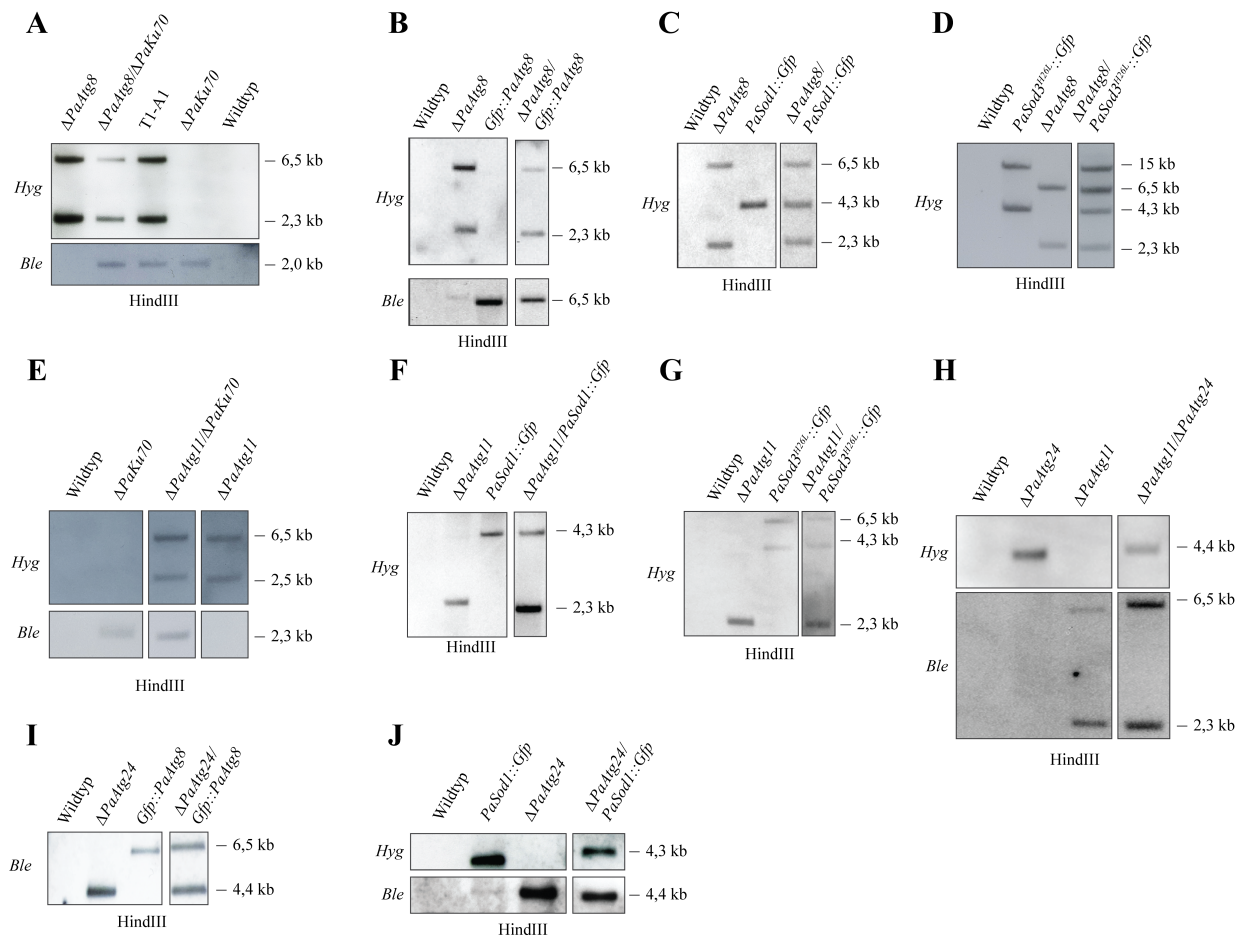


Abbildung S1: Southern Blot-Analyse zur Verifizierung der erstellten Stämme und Doppelmutanten. Zur Analyse der Stämme erfolgte die Isolation genomischer DNA der jeweiligen Stämme und anschließender Restriktion mit HindIII. Es folgte die Auftrennung für 1,5 h bei 80 V über ein 1 %-iges TAE-Agarosgel und nachfolgende Übertragung auf eine Nylon-Membran. Die Detektion der verwendeten Resistenzkassetten erfolgte durch die Verwendung von Sonden der Phleomycinresistenzkassette (*Ble*), bzw. der Hygromycinresistenzkassette (*Hyg*). **(A)** Bestätigung von $\Delta PaAtg8$ im Hintergrund des $PaKu70$ -Deletionsstammes, basierend auf der Primärtransformante T1-A1. **(B)** Nachweis der Doppelmutante $\Delta PaAtg8/Gfp::PaAtg8$, die zur Komplementation des Deletionsstammes verwendet wurde. **(C)** Verifizierung der Doppelmutante $\Delta PaAtg8/PaSod1::Gfp$ zur Analyse der nicht-selektiven Autophagie. **(D)** Erstellung der Doppelmutante $\Delta PaAtg8/PaSod3^{H26L}::Gfp$ zur Untersuchung der Mitophagie. **(E)** Bestätigung des $PaAtg11$ -Deletionsstammes. **(F)** Nachweis von $\Delta PaAtg11/PaSod1::Gfp$ zur Analyse der nicht-selektiven Autophagie. **(G)** Stammerstellung zur Untersuchung der Mitophagie durch $\Delta PaAtg11/PaSod3^{H26L}::Gfp$. **(H)** Verifizierung der Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$. **(I)** Bestätigung des Stammes $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$, der zur Untersuchung der Autophagosomen verwendet wurde. **(J)** Verifizierung der Doppelmutante $\Delta PaAtg24/PaSod1::Gfp$ zur Betrachtung der nicht-selektiven Autophagie.

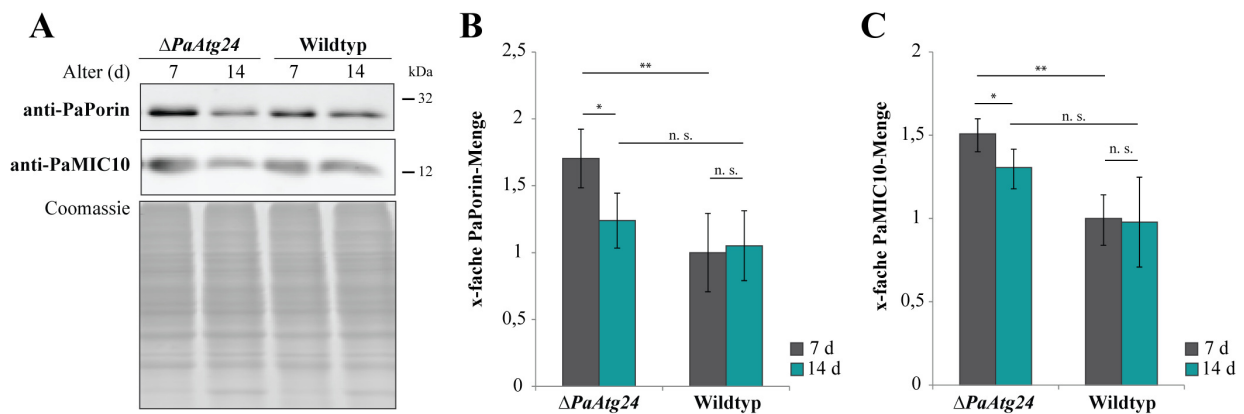


Abbildung S2: Auswirkung des Verlustes von PaATG24 auf die Mitochondrienmenge.

(A) Western Blot-Analyse von 75 µg Gesamtprotein des Wildstammes und $\Delta PaAtg24$ nach 12 %-iger SDS-PAGE und Inkubation mit anti-PaPorin, bzw. anti-PaMIC10-Antikörper. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der (B) PaPorin und (C) PaMIC10-Menge mit jeweils n=4 von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24$ und Wildstämmen. Die Normalisierung erfolgte auf das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel und der 7 Tage alte Wildstamm wurde auf 1 gesetzt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet (n. s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$).

$\Delta PaAtg11/PaSod3^{H26L}::Gfp$

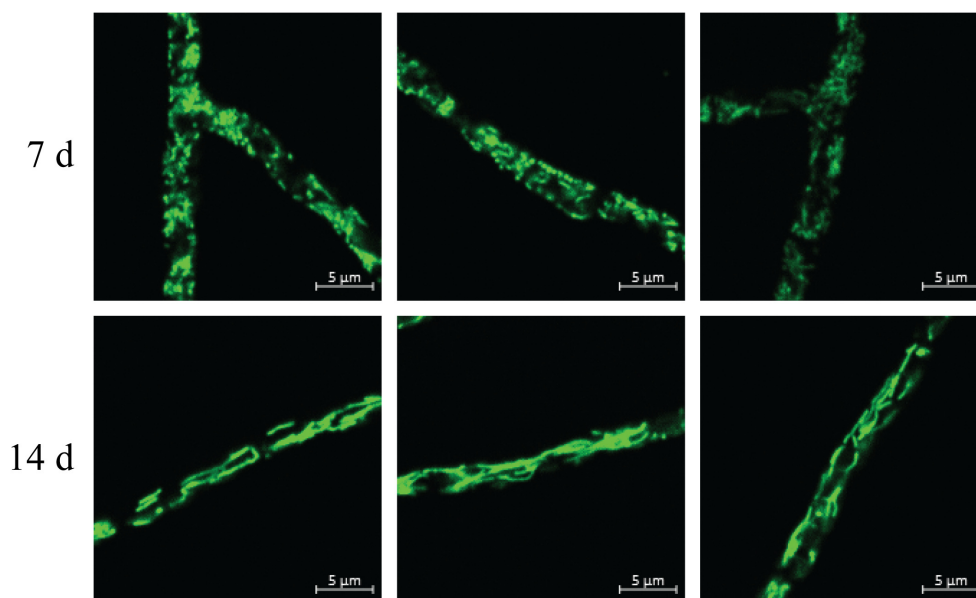


Abbildung S3: Auswahl weiterer Mikroskopiebilder der Mitochondrien nach Verlust von PaATG11.

Mikroskopische Analyse der Mitochondrien $\Delta PaAtg11/PaSod3^{H26L}::Gfp$ in 7 und 14 Tage alten Stämmen zur Verdeutlichung der unerwarteten Veränderung der Mitochondrienmorphologie im Laufe der Alterung von $\Delta PaAtg11$. Es wurden jeweils n=3 biologische Replikate jedes Altersstadiums verwendet. Der Maßstab entspricht 5 µm, die Belichtungszeit bei allen Aufnahmen betrug 0,7 ms.

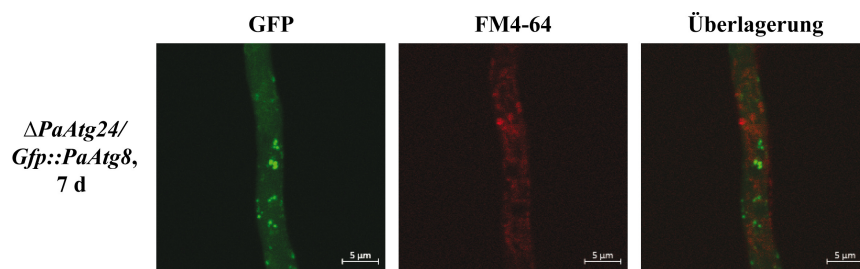


Abbildung S4: Die PaATG8-Punkte in $\Delta PaAtg24$ sind nicht in der Vakuole lokalisiert. Mikroskopische Überprüfung von $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ nach Färbung der Vakuolenmembran mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FM4-64 für 5 h um ausschließen zu können, dass es sich um vakuoläres PaATG8::GFP handelt. Der Maßstab entspricht 5 μm .

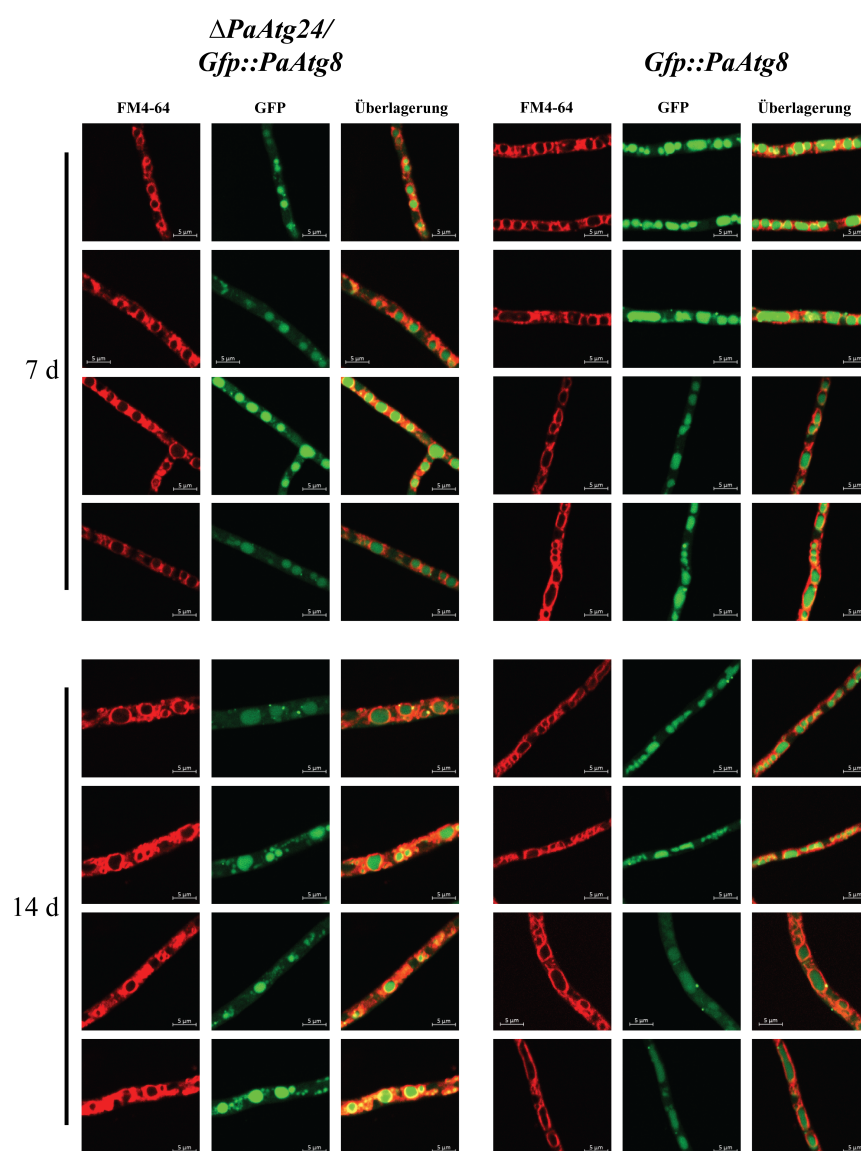


Abbildung S5: Auswahl weiterer repräsentativer Mikroskopiebilder zur Autophagosomen-Vakuolen-Fusion in $\Delta PaAtg24$.

Mikroskopische Analyse von 7 und 14 Tage alten $\Delta PaAtg24/Gfp::PaAtg8$ und $Gfp::PaAtg8$ ($n = 3$, jeweils) nach Kultivierung für einen Tag auf M2-N \downarrow -Medium. Die Färbung der Vakuolenmembran erfolgte mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FM4-64 für 5 h. Die Belichtungszeit des GFP-Kanals beträgt jeweils 3 ms und der Maßstab entspricht 5 μm .

Literaturverzeichnis

- Acevedo-Torres K, Fonseca-Williams S, Ayala-Torres S und Torres-Ramos CA (2009) Requirement of the *Saccharomyces cerevisiae* APN1 gene for the repair of mitochondrial DNA alkylation damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50: 317–327
- Adachi A, Koizumi M und Ohsumi Y (2017) Autophagy induction under carbon starvation conditions is negatively regulated by carbon catabolite repression. *The Journal of Biological Chemistry* 292: 19905–19918
- Ames BN (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Research Communications* 7: 121–128
- Ano Y, Hattori T, Oku M, Mukaiyama H, Baba M, Ohsumi Y, Kato N und Sakai Y (2005) A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate. *Molecular Biology of the Cell* 16: 446–457
- Antón Z, Betin VMS, Simonetti B, Traer CJ, Attar N, Cullen PJ und Lane JD (2020) A heterodimeric SNX4–SNX7 SNX-BAR autophagy complex coordinates ATG9A trafficking for efficient autophagosome assembly. *Journal of Cell Science* 133: jcs246306
- Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T und Kang D (2011) Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Molecular Biology of the Cell* 22: 3206–3217
- Arlt H, Reggiori F und Ungermann C (2015) Retromer and the dynamin Vps1 cooperate in the retrieval of transmembrane proteins from vacuoles. *Journal of Cell Science* 128: 645–655
- Aubert G und Lansdorp PM (2008) Telomeres and aging. *Physiological Reviews* 88: 557–579
- Baba M, Osumi M, Scott SV, Klionsky DJ und Ohsumi Y (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *The Journal of Cell Biology* 139: 1687–1695
- Backues SK, Orban DP, Bernard A, Singh K, Cao Y und Klionsky DJ (2015) Atg23 and Atg27 act at the early stages of Atg9 trafficking in *S. cerevisiae*. *Traffic* 16: 172–190
- Balderhaar HJK, Arlt H, Ostrowicz C, Bröcker C, Sündermann F, Brandt R, Babst M und Ungermann C (2010) The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *Journal of Cell Science* 123: 4085–4094

- Ballard PA, Tetrud JW und Langston JW (1985) Permanent human parkinsonism due to 1-methyl 1–4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Seven cases. *Neurology* 35: 949–949
- Bárcena C, Mayoral P und Quirós PM (2018) Mitohormesis, an antiaging paradigm. *International Review of Cell and Molecular Biology* 340: 35–77
- Barclay RD, Burd NA, Tyler C, Tillin NA und Mackenzie RW (2019) The role of the IGF-1 signaling cascade in muscle protein synthesis and anabolic resistance in aging skeletal muscle. *Frontiers in Nutrition* 6: 146
- Barth H, Meiling-Wesse K, Epple UD und Thumm M (2001) Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS Letters* 508: 23–28
- Bartkova J et al. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633–637
- Barz S, Kriegenburg F, Henning A, Bhattacharya A, Mancilla H, Sánchez-Martín P und Kraft C (2020) Atg1 kinase regulates autophagosome-vacuole fusion by controlling SNARE bundling. *EMBO Reports* 21: e51869
- Bas L, Papinski D, Licheva M, Torggler R, Rohringer S, Schuschnig M und Kraft C (2018) Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. *The Journal of Cell Biology* 217: 3656–3669
- Bean BDM, Davey M und Conibear E (2017) Cargo selectivity of yeast sorting nexins. *Traffic* 18: 110–122
- Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research* 231: 11–30
- Best JT, Xu P, McGuire JG, Leahy SN und Graham TR (2020) Yeast synaptobrevin, Snc1, engages distinct routes of post-endocytic recycling mediated by a sorting nexin, Rcy1-COPI, and retromer. *Molecular Biology of the Cell* 31: 944–962
- Blažek R, Polačik M und Reichard M (2013) Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4: 24
- Bonifacino JS und Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153–166
- Bonifacino JS und Rojas R (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 568–579

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254
- Brennand A, Rico E, Rigden DJ, Van Der Smissen P, Courtoy PJ und Michels PAM (2015) ATG24 represses autophagy and differentiation and is essential for homeostasy of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *PLOS ONE* 10: e0130365
- Bright NA, Gratian MJ und Luzio JP (2005) Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Current Biology* 15: 360–365
- Brunner M (2016) Untersuchung zur Rolle von PaATG24 in der selektiven Autophagie und der Alterung von *Podospora anserina*. Masterarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Burda P, Padilla SM, Sarkar S und Emr SD (2002) Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *Journal of Cell Science* 115: 3889–3900
- Cabrera M, Nordmann M, Perz A, Schmedt D, Gerondopoulos A, Barr F, Piehler J, Engelbrecht-Vandré S und Ungermann C (2014) The Mon1-Ccz1 GEF activates the Rab7 GTPase Ypt7 via a longin-fold-Rab interface and association with PI3P-positive membranes. *Journal of Cell Science* 127: 1043–1051
- Camougrand N, Kissová I, Salin B und Devenish RJ (2008) Monitoring mitophagy in yeast. *Methods in Enzymology* 451: 89–107
- Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT und Nixon RA (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid β deposition in sporadic alzheimer's disease and down syndrome: Differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *The American Journal of Pathology* 157: 277–286
- Chan EY und Tooze SA (2009) Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy* 5: 758–765
- Chen Y et al. (2014) A Vps21 endocytic module regulates autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 25: 3166–3177
- Cheung PyP und Pfeffer SR (2016) Transport vesicle tethering at the trans Golgi network: Coiled coil proteins in action. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4: 18
- Chi RJ, Harrison MS und Burd CG (2015) Biogenesis of endosome-derived transport carriers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72: 3441–3455

- Chutna O et al. (2014) The small GTPase Rab11 co-localizes with α -synuclein in intracellular inclusions and modulates its aggregation, secretion and toxicity. *Human Molecular Genetics* 23: 6732–6745
- Cuervo AM und Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research* 24: 92–104
- Cui L, Zhao H, Yin Y, Liang C, Mao X, Liu Y, Yu Q und Li M (2019) Function of Atg11 in non-selective autophagy and selective autophagy of *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516: 1152–1158
- Cullen PJ (2008) Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 574–582
- Darsow T, Rieder SE und Emr SD (1997) A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *The Journal of Cell Biology* 138: 517–529
- Day KJ, Casler JC und Glick BS (2018) Budding yeast has a minimal endomembrane system. *Developmental Cell* 44: 56–72.e4
- De Magalhães JP (2013) How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer* 13: 357–365
- Di Micco R et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444: 638–642
- Dove SK et al. (2004) Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *The EMBO Journal* 23: 1922–1933
- Dulić V und Riezman H (1990) *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking a functional vacuole are defective for aspects of the pheromone response. *Journal of Cell Science* 97: 517–525
- Eitzen G, Will E, Gallwitz D, Haas A und Wickner W (2000) Sequential action of two GTPases to promote vacuole docking and fusion. *The EMBO Journal* 19: 6713–6720
- Ermolaeva M, Neri F, Ori A und Rudolph KL (2018) Cellular and epigenetic drivers of stem cell ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19: 594–610
- Eskelinen EL (2019) Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 111: 1–10

- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT und Jahn R (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15781–15786
- Ferrucci L und Fabbri E (2018) Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology* 15: 505–522
- Fischer F, Langer JD und Osiewacz HD (2015) Identification of potential mitochondrial CLPX protease interactors and substrates suggests its central role in energy metabolism. *Scientific Reports* 5: 18375
- Fischer F, Weil A, Hamann A und Osiewacz HD (2013) Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal ClpP deletion strain. *Nature Communications* 4: 1397
- Fischer von Mollard G und Stevens TH (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Molecular Biology of the Cell* 10: 1719–1732
- Fukuda T und Kanki T (2021) Atg43, a novel autophagy-related protein, serves as a mitophagy receptor to bridge mitochondria with phagophores in fission yeast. *Autophagy* 17: 826–827
- Furukawa K, Fukuda T, Yamashita Si, Saigusa T, Kurihara Y, Yoshida Y, Kirisako H, Nakatogawa H und Kanki T (2018) The PP2A-like protein phosphatase Ppg1 and the Far complex cooperatively counteract CK2-Mediated phosphorylation of Atg32 to inhibit mitophagy. *Cell Reports* 23: 3579–3590
- Gallardo G und Holtzman DM (2019) Amyloid- β and Tau at the crossroads of alzheimer's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1184: 187–203
- Gallon M und Cullen PJ (2015) Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochemical Society Transactions* 43: 33–47
- Galluzzi L et al. (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* 36: 1811–1836
- Gan Z, Ram S, Ober RJ und Ward ES (2013) Using multifocal plane microscopy to reveal novel trafficking processes in the recycling pathway. *Journal of Cell Science* 126: 1176–1188
- Gao J, Kurre R, Rose J, Walter S, Fröhlich F, Piehler J, Reggiori F und Ungermann C (2020) Function of the SNARE Ykt6 on autophagosomes requires the Dsl1 complex and the Atg1 kinase complex. *EMBO Reports* 21: e50733

- Gao J, Langemeyer L, Kümmel D, Reggiori F und Ungermann C (2018) Molecular mechanism to target the endosomal Mon1-Ccz1 GEF complex to the pre-autophagosomal structure. *eLife* 7: e31145
- Garrett-Bakelman FE et al. (2019) The NASA twins study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science* 364: eaau8650
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ und Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology* 12: 119–131
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O’Shea EK und Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737–741
- Grief J (2007) Untersuchungen zur molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Haas A, Scheglmann D, Lazar T, Gallwitz D und Wickner W (1995) The GTPase Ypt7p of *Saccharomyces cerevisiae* is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance. *The EMBO Journal* 14: 5258–5270
- Haddad D und Nakamura K (2015) Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson’s disease. *FEBS Letters* 589: 3702–3713
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Barr VA, Haft DH und Taylor SI (1998) Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Molecular and Cellular Biology* 18: 7278–7287
- Harding TM, Morano KA, Scott SV und Klionsky DJ (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of Cell Biology* 131: 591–602
- Hardy JA und Higgins GA (1992) Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184–185
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11: 298–300
- Harrison DE et al. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460: 392–395
- Hayflick L (1998) How and why we age. *Experimental Gerontology* 33: 639–653

- Hayflick L und Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25: 585–621
- He C, Song H, Yorimitsu T, Monastyrska I, Yen WL, Legakis JE und Klionsky DJ (2006) Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *The Journal of Cell Biology* 175: 925–935
- He Y, Deng YZ und Naqvi NI (2013) Atg24-assisted mitophagy in the foot cells is necessary for proper asexual differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *Autophagy* 9: 1818–1827
- Henkel V, Schürmanns L, Brunner M, Hamann A und Osiewacz HD (2020) Role of sorting nexin PaATG24 in autophagy, aging and development of *Podospora anserina*. *Mechanisms of Ageing and Development* 186: 111211
- Hettema EH, Lewis MJ, Black MW und Pelham HRB (2003) Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *The EMBO Journal* 22: 548–557
- Hierro A, Rojas AL, Rojas R, Murthy N, Effantin G, Kajava AV, Steven AC, Bonifacino JS und Hurley JH (2007) Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449: 1063–1067
- Hipp MS, Park SH und Hartl FU (2014) Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology* 24: 506–514
- Holtze S et al. (2021) Alternative Animal Models of Aging Research. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8: 660959
- Hudgins AD, Tazearslan C, Tare A, Zhu Y, Huffman D und Suh Y (2018) Age- and tissue-specific expression of senescence biomarkers in mice. *Frontiers in Genetics* 9: 59
- Hughes AL und Gottschling DE (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* 492: 261–265
- Hughes AL, Hughes CE, Henderson KA, Yazvenko N und Gottschling DE (2016) Selective sorting and destruction of mitochondrial membrane proteins in aged yeast. *eLife* 5: e13943
- Hunt SD, Townley AK, Danson CM, Cullen PJ und Stephens DJ (2013) Microtubule motors mediate endosomal sorting by maintaining functional domain organization. *Journal of Cell Science* 126: 2493–2501

- Hurria A, Jones L und Muss HB (2016) Cancer treatment as an accelerated aging process: Assessment, biomarkers, and interventions. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 35: e516–522
- Ichimura Y et al. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408: 488–492
- Ilyinsky NS, Nesterov SV, Shestoperova EI, Fonin AV, Uversky VN und Gordeliy VI (2021) On the role of normal aging processes in the onset and pathogenesis of diseases associated with the abnormal accumulation of protein aggregates. *Biochemistry. Biokhimiia* 86: 275–289
- Ishihara N, Hamasaki M, Yokota S, Suzuki K, Kamada Y, Kihara A, Yoshimori T, Noda T und Ohsumi Y (2001) Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Molecular Biology of the Cell* 12: 3690–3702
- Itakura E, Kishi C, Inoue K und Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell* 19: 5360–5372
- Jao CC, Ragusa MJ, Stanley RE und Hurley JH (2013) A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 5486–5491
- Jayaraj GG, Hipp MS und Hartl FU (2020) Functional modules of the proteostasis network. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12: a033951
- Jørgensen MU, Emr SD und Winther JR (1999) Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 260: 461–469
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M und Ohsumi Y (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 16: 2544–2553
- Kama R, Robinson M und Gerst JE (2007) Btn2, a Hook1 ortholog and potential Batten disease-related protein, mediates late endosome-Golgi protein sorting in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 27: 605–621
- Kang S, Shin KD, Kim JH und Chung T (2018) Autophagy-related (ATG) 11, ATG9 and the phosphatidylinositol 3-kinase control ATG2-mediated formation of autophagosomes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 37: 653–664

- Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M und Klionsky DJ (2009) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental Cell* 17: 98–109
- Kanki T et al. (2013) Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Reports* 14: 788–794
- El-Khoury R, Sellem CH, Coppin E, Boivin A, Maas MFPM, Debuchy R und Sainsard-Chanet A (2008) Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Current Genetics* 53: 249–258
- Killock D (2014) Life gained, years lost? *Nature Reviews Clinical Oncology* 11: 303–303
- Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, Guan J, Hefner-Gravink A, Baba M, Scott SV, Ohsumi Y, Dunn WA und Klionsky DJ (2001) Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *The Journal of Cell Biology* 153: 381–396
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T und Ohsumi Y (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of Cell Biology* 147: 435–446
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T und Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of Cell Biology* 151: 263–276
- Kirkwood TB und Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408: 233–238
- Klaips CL, Jayaraj GG und Hartl FU (2018) Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of Cell Biology* 217: 51–63
- Knuppertz L (2012) Untersuchungen zur Bedeutung von Autophagie in dem filamentösen Hyphenpilz *Podospora anserina*. Masterarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Knuppertz L (2017) Autophagie und mitochondriale Qualitätskontrolle: Bedeutung für die Alterung des Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Knuppertz L, Hamann A, Pampaloni F, Stelzer E und Osiewacz HD (2014) Identification of autophagy as a longevity-assurance mechanism in the aging model *Podospora anserina*. *Autophagy* 10: 822–834

- Knuppertz L und Osiewacz HD (2016) Orchestrating the network of molecular pathways affecting aging: Role of nonselective autophagy and mitophagy. *Mechanisms of Ageing and Development* 153: 30–40
- Knuppertz L und Osiewacz HD (2017) Autophagy compensates impaired energy metabolism in CLPXP-deficient *Podospora anserina* strains and extends healthspan. *Aging Cell* 16: 704–715
- Knuppertz L, Warnsmann V, Hamann A, Grimm C und Osiewacz HD (2017) Stress-dependent opposing roles for mitophagy in aging of the ascomycete *Podospora anserina*. *Autophagy* 13: 1037–1052
- Kondapalli C et al. (2012) PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biology* 2: 120080
- Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, Matsunami M, Hashimoto A, Inagaki F, Ohsumi Y und Okamoto K (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 10631–10638
- Kotani T, Kirisako H, Koizumi M, Ohsumi Y und Nakatogawa H (2018) The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 10363–10368
- Krämer L und Ungermann C (2011) HOPS drives vacuole fusion by binding the vacuolar SNARE complex and the Vam7 PX domain via two distinct sites. *Molecular Biology of the Cell* 22: 2601–2611
- Kück U, Osiewacz HD, Schmidt U, Kappelhoff B, Schulte E, Stahl U und Esser K (1985) The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. *Current Genetics* 9: 373–382
- Kück U, Stahl U und Esser K (1981) Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Current Genetics* 3: 151–156
- Kunz JB, Schwarz H und Mayer A (2004) Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 9987–9996

- Lang T, Reiche S, Straub M, Bredschneider M und Thumm M (2000) Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *Journal of Bacteriology* 182: 2125–2133
- Langemeyer L, Fröhlich F und Ungermann C (2018) Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis. *Trends in Cell Biology* 28: 957–970
- Lee YK und Lee JA (2016) Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reports* 49: 424–430
- Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research* 8: 3–5
- Lemasters JJ (2014) Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biology* 2: 749–754
- Leprince C, Le Scolan E, Meunier B, Fraissier V, Brandon N, De Gunzburg J und Camonis J (2003) Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *Journal of Cell Science* 116: 1937–1948
- Li SC und Kane PM (2009) The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads. *Biochimica et Biophysica Acta. Lysosomes* 1793: 650–663
- Liu TT, Gomez TS, Sackey BK, Billadeau DD und Burd CG (2012) Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Molecular Biology of the Cell* 23: 2505–2515
- Liu X, Mao K, Yu AYH, Omairi-Nasser A, Austin J, Glick BS, Yip CK und Klionsky DJ (2016) The Atg17-Atg31-Atg29 complex coordinates with Atg11 to recruit the Vam7 SNARE and mediate autophagosome-vacuole fusion. *Current Biology* 26: 150–160
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M und Kroemer G (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell* 153: 1194–1217
- Lu L und Hong W (2014) From endosomes to the trans-Golgi network. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 31: 30–39
- Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z und Wan M (2013) Telomeres-structure, function, and regulation. *Experimental Cell Research* 319: 133–141
- Luce K und Osiewacz HD (2009) Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nature Cell Biology* 11: 852–858

- Lürick A, Gao J, Kuhlee A, Yavavli E, Langemeyer L, Perz A, Raunser S und Ungermann C (2017) Multivalent Rab interactions determine tether-mediated membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell* 28: 322–332
- Lürick A, Kuhlee A, Bröcker C, Kümmel D, Raunser S und Ungermann C (2015) The Habc domain of the SNARE Vam3 interacts with the HOPS tethering complex to facilitate vacuole fusion. *The Journal of Biological Chemistry* 290: 5405–5413
- Lu W, Wang C, Yang N, Que Y, Talbot NJ und Wang Z (2017) Genome-wide functional analysis reveals that autophagy is necessary for growth, sporulation, deoxynivalenol production and virulence in *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports* 7: 11062
- Ma M und Burd CG (2019) Retrograde trafficking and quality control of yeast synaptobrevin, Snc1, are conferred by its transmembrane domain. *Molecular Biology of the Cell* 30: 1729–1742
- Ma M und Burd CG (2020) Retrograde trafficking and plasma membrane recycling pathways of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 21: 45–59
- Ma M, Burd CG und Chi RJ (2017) Distinct complexes of yeast Snx4 family SNX-BARs mediate retrograde trafficking of Snc1 and Atg27. *Traffic* 18: 134–144
- Ma M, Kumar S, Purushothaman L, Babst M, Ungermann C, Chi RJ und Burd CG (2018) Lipid trafficking by yeast Snx4 family SNX-BAR proteins promotes autophagy and vacuole membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell* 29: 2190–2200
- Mao K, Wang K, Liu X und Klionsky DJ (2013) The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Developmental Cell* 26: 9–18
- Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E und Emr SD (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77: 579–586
- Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, Klionsky DJ und Reggiori F (2010) An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology* 190: 1005–1022
- Matscheko N, Mayrhofer P, Rao Y, Beier V und Wollert T (2019) Atg11 tethers Atg9 vesicles to initiate selective autophagy. *PLOS Biology* 17: e3000377

- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y und Ohsumi Y (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192: 245–250
- McHugh D und Gil J (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of Cell Biology* 217: 65–77
- McLelland GL, Lee SA, McBride HM und Fon EA (2016) Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system. *The Journal of Cell Biology* 214: 275–291
- McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, McBride HM und Fon EA (2014) Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *The EMBO Journal* 33: 282–295
- Meeßen A (2018) Herstellung und Charakterisierung von Autophagie-Mutanten in *Podospora anserina*. Bachelorarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 22: 132–139
- Mostoslavsky R et al. (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315–329
- Mukaiyama H, Baba M, Osumi M, Aoyagi S, Kato N, Ohsumi Y und Sakai Y (2004) Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Molecular Biology of the Cell* 15: 58–70
- Nakatogawa H (2020) Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 439–458
- Nanji T et al. (2017) Conserved and unique features of the fission yeast core Atg1 complex. *Autophagy* 13: 2018–2027
- Nazarko VY, Nazarko TY, Farré JC, Stasyk OV, Warnecke D, Ulaszewski S, Cregg JM, Sibirny AA und Subramani S (2011) Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy* 7: 375–385
- Nemec AA, Howell LA, Peterson AK, Murray MA und Tomko RJ (2017) Autophagic clearance of proteasomes in yeast requires the conserved sorting nexin Snx4. *The Journal of Biological Chemistry* 292: 21466–21480

- Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA und McBride HM (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Current Biology* 18: 102–108
- Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, Emr SD und Klionsky DJ (2002) Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 30198–30207
- Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y und Klionsky DJ (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *The Journal of Cell Biology* 148: 465–480
- Nordmann M, Cabrera M, Perz A, Bröcker C, Ostrowicz C, Engelbrecht-Vandré S und Ungermann C (2010) The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current Biology* 20: 1654–1659
- O’Sullivan MJ und Lindsay AJ (2020) The Endosomal Recycling Pathway—At the Crossroads of the Cell. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 6074
- Obara K, Sekito T und Ohsumi Y (2006) Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes—Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 17: 1527–1539
- Oberdoerffer P et al. (2008) SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135: 907–918
- Ohashi Y und Munro S (2010) Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi–endosomal system. *Molecular Biology of the Cell* 21: 3998–4008
- Okamoto K, Kondo-Okamoto N und Ohsumi Y (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental Cell* 17: 87–97
- Osgood EE (1955) Development and growth of hematopoietic tissues; with a clinically practical method of growth analysis. *Pediatrics* 15: 733–751
- Osiewicz HD und Borghouts C (2000) Cellular copper homeostasis, mitochondrial DNA instabilities, and lifespan control in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Experimental Gerontology* 35: 677–686

- Osiewacz HD und Esser K (1984) The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Current Genetics* 8: 299–305
- Osiewacz HD (2002a) Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mechanisms of Ageing and Development* 123: 755–764
- Osiewacz HD (2002b) Mitochondrial functions and aging. *Gene* 286: 65–71
- Osiewacz HD (2010) Role of mitochondria in aging and age-related disease. *Experimental Gerontology* 45: 465
- Osiewacz HD (2011) Mitochondrial quality control in aging and lifespan control of the fungal aging model *Podospora anserina*. *Biochemical Society Transactions* 39: 1488–1492
- Osiewacz HD, Hamann A und Zintel S (2013) Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Methods in Molecular Biology* 965: 439–462
- Pan H und Finkel T (2017) Key proteins and pathways that regulate lifespan. *Journal of Biological Chemistry* 292: 6452–6460
- Pan ZQ und Du LL (2020) Atg11-mediated activation of Atg1 kinase in fission yeast. *Autophagy* 2: 584–585
- Pan ZQ, Shao GC, Liu XM, Chen Q, Dong MQ und Du LL (2020) Atg1 kinase in fission yeast is activated by Atg11-mediated dimerization and cis-autophosphorylation. *eLife* 9: e58073
- Pearson KJ et al. (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metabolism* 8: 157–168
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45
- Philipp O, Hamann A, Osiewacz HD und Koch I (2017) The autophagy interaction network of the aging model *Podospora anserina*. *BMC Bioinformatics* 18: 196
- Philipp O, Hamann A, Servos J, Werner A, Koch I und Osiewacz HD (2013) A genome-wide longitudinal transcriptome analysis of the aging model *Podospora anserina*. *PLOS ONE* 8: e83109
- Pinan-Lucarré B, Balguerie A und Clavé C (2005) Accelerated cell death in *Podospora* autophagy mutants. *Eukaryotic Cell* 4: 1765–1774

- Pinan-Lucarré B, Paoletti M, Dementhon K, Coulary-Salin B und Clavé C (2003) Autophagy is induced during cell death by incompatibility and is essential for differentiation in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Molecular Microbiology* 47: 321–333
- Platzer M und Englert C (2016) *Nothobranchius Furzeri*: A Model for Aging Research and More. *Trends in Genetics* 32: 543–552
- Popelka H, Damasio A, Hinshaw JE, Klionsky DJ und Ragusa MJ (2017) Structure and function of yeast Atg20, a sorting nexin that facilitates autophagy induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E10112–E10121
- Popelka H, Klionsky DJ und Ragusa MJ (2018) An atypical BAR domain protein in autophagy. *Autophagy* 14: 1155–1156
- Priault M, Salin B, Schaeffer J, Vallette FM, di Rago JP und Martinou JC (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death and Differentiation* 12: 1613–1621
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH und van den Hondel CA (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117–124
- Qiu A, Zhang H, Kennedy BK und Lee A (2021) Spatio-temporal correlates of gene expression and cortical morphology across lifespan and aging. *NeuroImage* 224: 117426
- Rampello NG, Stenger M, Westermann B und Osiewacz HD (2018) Impact of F1Fo-ATP-synthase dimer assembly factors on mitochondrial function and organismic aging. *Microbial Cell* 5: 198–207
- Ravussin A, Brech A, Tooze SA und Stenmark H (2021) The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein SNX4 controls ATG9A recycling and autophagy. *Journal of Cell Science* 134: jcs250670
- Reggiori F, Shintani T, Nair U und Klionsky DJ (2005) Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 1: 101–109
- Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE und Klionsky DJ (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental Cell* 6: 79–90

- Rieder SE und Emr SD (1997) A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Molecular Biology of the Cell* 8: 2307–2327
- Rizet G (1953) [Impossibility of obtaining uninterrupted and unlimited multiplication of the ascomycete *Podospira anserina*]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences* 237: 838–840
- Ross CA und Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine* 10: S10–17
- Ruby JG, Smith M und Buffenstein R (2018) Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age. *eLife* 7: e31157
- Ruderman NB, Julia Xu X, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F und Ido Y (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298: E751–E760
- Saimani U und Kim K (2017) Traffic from the endosome towards trans-Golgi network. *European Journal of Cell Biology* 96: 198–205
- Sato TK, Rehling P, Peterson MR und Emr SD (2000) Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Molecular Cell* 6: 661–671
- Sato TK, Darsow T und Emr SD (1998) Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Molecular and Cellular Biology* 18: 5308–5319
- Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T und Osiewacz HD (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nature Cell Biology* 9: 99–105
- Scheckhuber CQ, Grief J, Boilan E, Luce K, Debacq-Chainiaux F, Rittmeyer C, Gredilla R, Kolbesen BO, Toussaint O und Osiewacz HD (2009) Age-related cellular copper dynamics in the fungal ageing model *Podospira anserina* and in ageing human fibroblasts. *PLOS ONE* 4: e4919
- Scheckhuber CQ, Rödel E und Wüstehube J (2008) Regulation of mitochondrial dynamics—characterization of fusion and fission genes in the ascomycete *Podospira anserina*. *Biotechnology Journal* 3: 781–790

- Schimmöller F und Riezman H (1993) Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. *Journal of Cell Science* 106: 823–830
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M und Ristow M (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism* 6: 280–293
- Schürmanns L (2015) Autophagie und mitochondriale Qualitätskontrolle: Bedeutung für die Alterung des Ascomyceten *Podospora anserina*. Bachelorarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Schürmanns L (2017) Herstellung und Charakterisierung von Autophagie-Mutanten in *Podospora anserina*. Masterarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Schürmanns L, Hamann A und Osiewacz HD (2022) Lifespan increase of *Podospora anserina* by oleic acid is linked to alterations in energy metabolism, membrane trafficking and autophagy. *Cells* 11: 519
- Scott SV, Baba M, Ohsumi Y und Klionsky DJ (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *Journal of Cell Biology* 138: 37–44
- Seals DF, Eitzen G, Margolis N, Wickner WT und Price A (2000) A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9402–9407
- Seaman MN, McCaffery JM und Emr SD (1998) A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *The Journal of Cell Biology* 142: 665–681
- Segarra VA, Boettner DR und Lemmon SK (2015) Atg27 tyrosine sorting motif is important for its trafficking and Atg9 localization. *Traffic* 16: 365–378
- Sekito T, Kawamata T, Ichikawa R, Suzuki K und Ohsumi Y (2009) Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes to Cells* 14: 525–538
- Seroude L, Brummel T, Kapahi P und Benzer S (2002) Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 1: 47–56
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D und Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593–602

- Servos J, Hamann A, Grimm C und Osiewacz HD (2012) A differential genome-wide transcriptome analysis: impact of cellular copper on complex biological processes like aging and development. *PLOS ONE* 7: e49292
- Shintani T, Suzuki K, Kamada Y, Noda T und Ohsumi Y (2001) Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 30452–30460
- Shintani T und Klionsky DJ (2004) Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 29889–29894
- Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, Braschi E, Rippstein P, Fon EA und McBride HM (2012a) A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Current Biology* 22: 135–141
- Soubannier V, Rippstein P, Kaufman BA, Shoubridge EA und McBride HM (2012b) Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLOS ONE* 7: e52830
- Stahl U, Lemke PA, Tudzynski P, Kück U und Esser K (1978) Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics* 162: 341–343
- Statistisches Bundesamt (2020) Kohortensterbetafeln für Deutschland - Ergebnisse aus den Modellrechnungen für Sterbetafeln nach Geburtsjahrgang 1920-2020. 5126101209004. Destatis
- Steinberg F, Gallon M, Winfield M, Thomas E, Bell AJ, Heesom KJ, Tavaré JM und Cullen PJ (2013) A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nature Cell Biology* 15: 461–471
- Stipanuk MH (2009) Macroautophagy and its role in nutrient homeostasis. *Nutrition Reviews* 67: 677–689
- Strømhaug PE, Reggiori F, Guan J, Wang CW und Klionsky DJ (2004) Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 15: 3553–3566

- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y und Inagaki F (2004) The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes to Cells* 9: 611–618
- Suzuki K, Kamada Y und Ohsumi Y (2002) Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Cell* 3: 815–824
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T und Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* 12: 209–218
- Suzuki SW und Emr SD (2018a) Membrane protein recycling from the vacuole/lysosome membrane. *The Journal of Cell Biology* 217: 1623–1632
- Suzuki SW und Emr SD (2018b) Retrograde trafficking from the vacuole/lysosome membrane. *Autophagy* 14: 1654–1655
- Sveinbjornsdottir S (2016) The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 139: 318–324
- Tadokoro T, Kikuma T und Kitamoto K (2015) Functional analysis of AoAtg11 in selective autophagy in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Biology* 119: 560–567
- Traer CJ, Rutherford AC, Palmer KJ, Wassmer T, Oakley J, Attar N, Carlton JG, Kremerskothen J, Stephens DJ und Cullen PJ (2007) SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nature Cell Biology* 9: 1370–1380
- Tsukada M und Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 333: 169–174
- Van der Rijt S, Molenaars M, McIntyre RL, Janssens GE und Houtkooper RH (2020) Integrating the hallmarks of aging throughout the tree of life: A focus on mitochondrial dysfunction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 594416
- Van Weering JRT, Sessions RB, Traer CJ, Kloer DP, Bhatia VK, Stamou D, Carlsson SR, Hurley JH und Cullen PJ (2012a) Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *The EMBO Journal* 31: 4466–4480
- Van Weering JRT, Verkade P und Cullen PJ (2012b) SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic* 13: 94–107

- Vida TA und Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* 128: 779–792
- Wang CW, Kim J, Huang WP, Abeliovich H, Stromhaug PE, Dunn WA und Klionsky DJ (2001) Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 30442–30451
- Wang CW, Stromhaug PE, Kauffman EJ, Weisman LS und Klionsky DJ (2003) Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. *The Journal of Cell Biology* 163: 973–985
- Wang CW, Stromhaug PE, Shima J und Klionsky DJ (2002) The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 47917–47927
- Wen X und Klionsky DJ (2016) An overview of macroautophagy in yeast. *Journal of Molecular Biology* 428: 1681–1699
- Westphal V, Marcusson EG, Winther JR, Emr SD und van den Hazel HB (1996) Multiple pathways for vacuolar sorting of yeast proteinase A. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 11865–11870
- Wickner W und Rizo J (2017) A cascade of multiple proteins and lipids catalyzes membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell* 28: 707–711
- Wurmser AE, Sato TK und Emr SD (2000) New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *The Journal of Cell Biology* 151: 551–562
- Xirocostas ZA, Everingham SE und Moles AT (2020) The sex with the reduced sex chromosome dies earlier: A comparison across the tree of life. *Biology Letters* 16: 20190867
- Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, Ichikawa R, Kinjo M und Ohsumi Y (2012) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology* 198: 219–233
- Yamasaki A und Noda NN (2017) Structural biology of the Cvt pathway. *Journal of Molecular Biology* 429: 531–542

- Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Yamaoka S, Tsutsumi N und Arimura SI (2016) Formation of mitochondrial outer membrane derived protrusions and vesicles in *Arabidopsis thaliana*. PLOS ONE 11: e0146717
- Yang Z und Klionsky DJ (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. Current Topics in Microbiology and Immunology 335: 1–32
- Yao W et al. (2020) Atg11 is required for initiation of glucose starvation-induced autophagy. Autophagy 12: 2206–2218
- Yen WL, Legakis JE, Nair U und Klionsky DJ (2007) Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. Molecular Biology of the Cell 18: 581–593
- Yin Z, Pascual C und Klionsky DJ (2016) Autophagy: machinery and regulation. Microbial Cell 3: 588–596
- Yorimitsu T und Klionsky DJ (2005) Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. Molecular Biology of the Cell 16: 1593–1605
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T und Ohsumi Y (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. The Plant Cell 16: 2967–2983
- Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J und Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. Journal of Cell Science 119: 3888–3900
- Yousefzadeh M, Henpita C, Vyas R, Soto-Palma C, Robbins P und Niedernhofer L (2021) DNA damage—how and why we age? eLife 10: e62852
- Zhao D, Liu XM, Yu ZQ, Sun LL, Xiong X, Dong MQ und Du LL (2016) Atg20- and Atg24-family proteins promote organelle autophagy in fission yeast. Journal of Cell Science 129: 4289–4304
- Zheng W et al. (2018) The endosomal recycling of FgSnc1 by FgSnx41-FgSnx4 heterodimer is essential for polarized growth and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. The New Phytologist 219: 654–671
- Zientara-Rytter K und Subramani S (2020) Mechanistic insights into the role of Atg11 in selective autophagy. Journal of Molecular Biology 432: 104–122

- Zintel S, Schwitalla D, Luce K, Hamann A und Osiewacz HD (2010) Increasing mitochondrial superoxide dismutase abundance leads to impairments in protein quality control and ROS scavenging systems and to lifespan shortening. *Experimental Gerontology* 45: 525–532
- Zvereva MI, Shcherbakova DM und Dontsova OA (2010) Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry* 75: 1563–1583

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	DTT	Dithiothreitol
°C	Grad Celsius	EE	<i>early endosome</i>
µg	Mikrogramm	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
µm	Mikrometer	ER	Endoplasmatisches Retikulum
µl	Mikroliter	et al.	<i>et alii / et aliae / et alia</i>
A	Adenin-Nukleotid	G	Guanin-Nukleotid
AmAc	Ammoniumacetat-BMM-Medium	g	Gramm
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase	GEF	<i>guanine exchange factors</i>
APS	Ammoniumpersulfat	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ATG	<i>Autophagy relatet protein/gene</i>	GTP	Guanosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	h	Stunden
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs	<i>hph</i>	Hygromycin-Resistenzgen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>ble</i>	Phleomycin-Resistenzgen	HOPS	<i>homotypic fusion and protein sorting</i>
BMM	Biomalz-Mais-Medium	Hyg	Hygromycin
bp	Basenpaare	IgG	Immunglobulin G
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	ILV	intraluminalen Vesikeln
C	Cytosin-Nukleotid	ISS	<i>international space station</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>	kDA	Kilodalton
cm	Zentimeter	l	Liter
CM	Complete-Medium	LB	„lysogeny broth“-Medium
CM-N↓	CM-Medium ohne Ammoniumchlorid	LBA	LB-Medium mit Ampicillin
CMA	<i>chaperon-mediated autophagy</i>	LE	<i>late endosome</i>
cvt	<i>cytoplasm-to-vacuole</i>	M2	Minimalmedium
CSPD	<i>chloro-5-substituted adamantlyl-1,2-dioxetane phosphate</i>	M2-Gly	Minimalmedium ohne Glycerin
d	Tage	M2-N↓	M2-Medium ohne Urea
DIG	Digoxigenin	M	Molar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mbar	Milibar
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	MDV	<i>mitochondrial-derived vesicles</i>
		mg	Miligramm

min	Minuten	PVDF	Polyvinylidenfluorid
MIPA	mikropexophagischer Membranapparat	PVE	pre-vakuläres Endosom
ml	Mililiter	PX	<i>phagocyte NADPH oxidase</i>
mm	Milimeter	Q	Glutaminyl-Rest
mM	Milimolar	qRT-PCR	<i>Quantitativ real-time PCR</i>
MMS	Methylmethansulfonat	R	Argininy-Rest
Mo	<i>Magnaporthe oryzae</i>	RNA	Ribonukleinsäure
mtDNA	Mitochondriale DNA	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
ms	Milisekunden	RT	Raumtemperatur
N	Nolar	s	Sekunde
n	Probenzahl	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
n. s.	nicht signifikant	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	SOD	Superoxiddismutasen
ng	Nanogramm	SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
nm	Nanometer	SNX4	Sortierendes Nexin 4
Pa	<i>Podospora anserina</i>	Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	SSC	<i>saline-sodium citrat</i>
PAS	prä-autophagosomalen Strukturen/ Phagophor-Assemblierungsstelle	STC	Sorbitol-Tris-Calciumchlorid
PCR	Polymerasekettenreaktion	T	Thymin-Nukleotid
PE	Phosphoenositol	Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>
PEG	Polyethylenglykol	TAE	Tris-Acetat-EDTA
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Phleo	Phleomycin	TE	Tris-EDTA
PI	Phosphoinositol	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PI3P	Phosphoinositol-3-Phosphat	TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase Komplexes I	TEN	<i>tubular endosomal network</i>
Pp	<i>Pichia pastoris</i>	TGN	trans-Golgi-Netzwerk
PPN	Polypropylen	TOR	(<i>target of rapamycin</i>)
		TPS	Transformations-Phosphat-SaccharosePuffer

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
VD	<i>vacuolar domain</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 | Übersicht der verschiedenen Wege des endosomalen Transports.

Abbildung 2 | Betrachtung der verschiedenen Autophagieformen.

Abbildung 3 | Lebenszyklus eines Autophagosoms.

Abbildung 4 | Aufbau des ATG1-Komplexes.

Abbildung 5 | Proteine und Komplexe der Bildung der Autophagosomenmembran.

Abbildung 6 | Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole.

Abbildung 7 | Der Verlust von PaATG8 führt zu hellem Myzel, einer verringerten Wachstumsrate und einer verkürzten Lebensspanne.

Abbildung 8 | PaATG8 wird für die nicht-selektive Autophagie benötigt.

Abbildung 9 | Ein PaATG8-unabhängiger Abbau eines mitochondrialen Proteins ist möglich.

Abbildung 10 | Charakterisierung der *PaAtg11*-Deletionsmutante.

Abbildung 11 | PaATG11 ist an der nicht-selektiven Autophagie und der Mitophagie beteiligt.

Abbildung 12 | Charakterisierung der *PaAtg24*-Deletionsmutante.

Abbildung 13 | Untersuchungen zur Autophagie im *PaAtg24*-Deletionsstamm.

Abbildung 14 | Analyse der Lebensspanne von Wildtyp, $\Delta PaAtg11$ und $\Delta PaAtg24$ bei Kultivierung auf M2-Medium mit Glycerin.

Abbildung 15 | Effekt des Verlusts von PaATG11 und PaATG24 auf die Mitochondrienmorphologie.

Abbildung 16 | Einfluss der Mitochondrienmorphologie auf die Mitochondrienfunktion in $\Delta PaAtg11$.

Abbildung 17 | Charakterisierung der Doppelmutante $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$.

Abbildung 18 | Analyse der Mitochondrienfunktion von $\Delta PaAtg11/\Delta PaAtg24$ durch Kultivierung auf Glycerin-Medium.

Abbildung 19 | Die Fragmentierung juveniler Mitochondrien in $\Delta PaAtg11$ ist PaATG24-abhängig.

Abbildung 20 | PaATG24 während der Alterung von *P. anserina*.

Abbildung 21 | PaATG24-Proteinmenge bei Beeinträchtigung bzw. Induktion der Autophagie.

Abbildung 22 | Betrachtung der e-Expression und PaATG8-Proteinmenge nach Verlust von PaATG24.

Abbildung 23 | Verlust von PaATG24 führt zu einem reduzierten autophagosomalen Fluss und einer Akkumulation von Autophagosomen.

Abbildung 24 | PaATG24 ist in der Nähe der Vakuolen lokalisiert.

Abbildung 25 | Die Autophagosomen-Vakuolen-Fusion ist PaATG24-unabhängig.

Abbildung 26 | PaATG24 reguliert die Größe und Morphologie von Vakuolen.

Abbildung 27 | Übersicht der Phasen der Mitophagie.

Abbildung 28 | Auswirkung des Verlusts von PaATG24 in *P. anserina*.

Abbildung S1 | Southern Blot-Analyse zur Verifizierung der erstellten Stämme und Doppelmutanten.

Abbildung S2 | Auswirkung des Verlustes von PaATG24 auf die Mitochondrienmenge.

Abbildung S3 | Auswahl weiterer Mikroskopiebilder der Mitochondrien nach Verlust von PaATG11.

Abbildung S4 | Die PaATG8-Punkte in $\Delta PaAtg24$ sind nicht in der Vakuole lokalisiert.

Abbildung S5 | Auswahl weiterer repräsentativer Mikroskopiebilder zur Autophagosomen-Vakuolen-Fusion in $\Delta PaAtg24$.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 | Liste der verwendeten Chemikalien und Stoffe.

Tabelle 2 | Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer.

Tabelle 3 | Die verwendeten Anzuchtsmedien zur Kultivierung von *P. anserina* und *E. coli*.

Tabelle 4 | Übersicht der verwendeten *P. anserina* Stämme und Isolate.

Tabelle 5 | Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Tabelle 6 | Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 7 | Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Tabelle 8 | Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen Kits.

Tabelle 9 | Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierensonden.

Tabelle 10 | Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Tabelle 11 | Verwendete Größenstandards zur Bestimmung der Gen- und Proteingrößen.

Tabelle 12 | Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Tabelle 13 | Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Programme.

Tabelle 14 | Überblick der genutzten Materialien.

Tabelle 15 | Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA.

Tabelle 16 | Darstellung der optimalen Anlagerungstemperatur, Oligonukleotidkonzentration und die ermittelte Effizienz der verwendeten Oligonukleotidpaare.

Publikationen und Konferenzen

Publikationen	<p>Klionsky DJ, ..., Henkel V, ..., Tong CK (2021) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). <i>Autophagy</i>. 17: 1-382. https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280.</p> <p>Henkel V, Schürmanns L, Brunner B, Hamann A, Osiewacz HD (2020) Role of sorting nexin PaATG24 in autophagy, aging and development of <i>Podospora anserina</i>. <i>Mech Ageing Dev</i> 186: 111211. https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111211.</p> <p>Henkel V, Warnsmann V, Osiewacz HD (2017) Autophagic responses compensate mitochondrial impairments. <i>Aging</i> 9: 1947-1948. https://doi.org/10.18632/aging.101292</p>
Vorträge	<p>PaATG24, a sorting nexin involved in the control of autophagy, aging and development 05.-06. Dezember 2019, Universität Ulm Annual Meeting of the German Association for Aging Research</p>
Poster	<p>The role of ATG24 in autophagy, aging and development in <i>Podospora anserina</i> 2.-6. September 2018, Goethe-Universität Frankfurt 2nd Frankfurt Conference on Quality Control in Life processes</p> <p>Deletion of <i>PaAtg24</i> reduces lifespan in <i>Podospora anserina</i> and impairs general and selective autophagy 25.-29. September 2017, Cavtat-Dubrovnik, Kroatien EMBO Conference - Autophagy - From molecular principles to human diseases</p>