

Aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Regulation der Autophagie durch Miz1 in Brustdrüsenzellen und embryonalen Fibroblasten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tanja Paul aus München

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 09.05.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. H.-P. Elsässer

1. Korreferent: Herr PD M. Henke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Autophagie	1
1.1.1	Ablauf der Autophagie	2
1.1.1.1	Überblick über die Autophagosomenformation	2
1.1.1.2	Bildung und Herkunft der Phagophore	2
1.1.1.3	Initiation der Autophagosomenbildung	4
1.1.1.4	Atg9	5
1.1.1.5	Elongation der Isolationsmembran	5
1.1.1.6	Reifung und Transport der Autophagosomen und deren Verschmelzung mit Lysosomen	7
1.1.1.7	Das Lysosom	8
1.1.1.8	Die Atg5/Atg7-unabhängige Autophagie	8
1.1.2	Regulation der Autophagie	9
1.1.3	Physiologische Funktionen und klinische Relevanz der Autophagie	11
1.2	Der Transkriptionsfaktor Miz1	14
1.2.1	Strukturelle Eigenschaften	14
1.2.2	Funktionelle Eigenschaften von Miz1	15
1.2.2.1	Transkriptionsregulierung durch Miz1	15
1.2.2.2	Zielgene und damit verbundene Funktionen von Miz1	17
1.2.2.3	Funktionen von Miz1 im Zytoplasma	19
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte	22
2.1.1	Glas- und Plastikwaren	23
2.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	24
2.1.3	Computer-Software und Internetseiten	26
2.2	Zellkultur	27
2.2.1	Verwendete Zelllinien	27
2.2.2	Verwendete Medien und Kulturbedingungen	27
2.2.2.1	Kultivierung von HC11-Zellen	27
2.2.2.2	Differenzierung von HC11-Zellen	28
2.2.2.3	Kultivierung von Δ POZ/Cre-ER-MEFs	28

2.2.2.4	Induktion des Miz1-Knockdowns in Δ POZ/Cre-ER-MEFs	29
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.4	Stimulation der Autophagie in Zellen	30
2.2.4.1	Stimulation der Zellen durch EBSS und HBSS.....	30
2.2.4.2	Stimulation der Zellen durch Rapamycin.....	31
2.2.5	Infektion von Zellen mit Retroviren.....	31
2.2.6	Herstellung von HC11-Zelllinien, die GFP-markiertes LC3 stabil über-exprimieren	33
2.2.6.1	Transfektion von Zellen durch Lipofectamine TM 2000	33
2.2.6.2	Entwicklung einer stabilen Zelllinie	34
2.2.7	Immunzytochemische Färbungen	34
2.2.7.1	LC3-Immunfluoreszenz-Färbung	35
2.2.7.2	Fixierung von Zellen, die GFP-markiertes LC3 überexprimierten.....	37
2.2.7.3	Phalloidin-Färbung	37
2.2.8	Elektronenmikroskopie	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	40
2.3.1	Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen	40
2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmungen.....	41
2.3.3	cDNA-Synthese	42
2.3.4	Semiquantitative PCR.....	42
2.3.5	<i>Real Time</i> PCR.....	43
2.3.6	Plasmidaufreinigung und Vervielfältigung	46
2.3.6.1	Herstellung von Luria-Bertani Medium (LB-Medium)	46
2.3.6.2	Herstellung und Beimpfung von Agar-Platten	47
2.3.6.3	Amplifizierung der Plasmid-DNA.....	47
2.3.6.4	Maxi-Präparation.....	48
2.3.7	Restriktionsverdau	48
2.3.8	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.3.9	DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen	50
2.3.10	Genotypisierung	50
2.4	Proteinbiochemie.....	51
2.4.1	Herstellung von Gesamtzelllysaten	51
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Assays	52
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	53
2.4.4	Western Blot.....	54
2.4.5	Immundetektion	55

3	Ergebnisse	57
3.1	Autophagie in den Brustdrüsenzellen HC11 in Abhängigkeit von Miz1	57
3.1.1	Die Zelllinie HC11	57
3.1.2	Autophagie in HC11-Zellen	57
3.1.2.1	Methoden zur Induktion von Autophagie	57
3.1.3	Genexpressionsanalysen in Zellen, die mit EBSS stimuliert wurden	60
3.1.4	Darstellung der Miz1-Expression auf Proteinebene in Zellen, die mit EBSS stimuliert wurden	66
3.1.5	Infektion von HC11-Zellen mit Myc-, MycVD-, Miz1-, shMiz1-, pBABEpuro- und shScr-Vektoren	67
3.1.5.1	Überprüfung der Konstrukte auf Proteinebene	68
3.1.5.2	Überprüfung der Konstrukte auf RNA-Ebene	68
3.1.5.3	Überprüfung der Myc und MycVD-Konstrukte	69
3.1.5.4	Induktion der Autophagie durch EBSS	70
3.1.6	Elektronenmikroskopische Analyse von Myc bzw. MycVD überexprimierenden Zellen nach Induktion von Autophagie	78
3.1.7	Genexpressionsanalysen von Myc bzw. MycVD überexprimierenden Zellen nach Induktion von Autophagie	81
3.1.7.1	Vergleich der Expression Autophagie-assoziiierter Gene	82
3.1.7.2	Vergleich der Expression von Genen, die durch Miz1 reguliert werden	84
3.1.8	Transfektion von HC11-Zellen mit GFP-LC3-Plasmiden	86
3.2	Autophagie in MEFs in Abhängigkeit von Miz1	91
3.2.1	Die Zelllinie Δ POZ/Cre-ER-MEFs	91
3.2.2	Morphologische Analyse der Δ POZ/Cre-ER-MEFs unter EBSS-Behandlung	95
3.2.3	Genexpressionsanalysen in Δ POZ/Cre-ER-MEFs	97
3.2.3.1	Nachweis des Miz1-Knockdowns in Δ POZ/Cre-ER-MEFs mit Hilfe der qRT-PCR	99
3.2.3.2	Expression Autophagie-assoziiierter Gene in Δ POZ/Cre-ER-MEFs	100
4	Diskussion	102
4.1	Die Rolle von Miz1 bei zellulären Reaktionen auf nährstoffarme Bedingungen in HC11-Zellen	102
4.2	Autophagie in HC11-Zellen in Abhängigkeit von Miz1 und Myc, sowie deren Interaktion	109
4.3	Untersuchung der Autophagie in embryonalen Mausfibroblasten mit induzierbarem Miz1/ΔPOZ-Domäne-Knockout	116
5	Zusammenfassung	120
5.1	Deutsche Zusammenfassung	120

5.2	Englische Zusammenfassung.....	121
6	Literaturverzeichnis.....	123
7	Abkürzungsverzeichnis.....	136
8	Anhang.....	143
	Danksagung	143
	Liste akademischer Lehrer	144

1 Einleitung

1.1 Autophagie

Das Wort „Autophagie“ leitet sich aus dem Altgriechischen ab und setzt sich aus der Vorsilbe „auto“ (=selbst) und dem Wortstamm „phagie“ (=essen) zusammen. Es handelt sich um einen zellulären Mechanismus, durch den vor allem unter nährstoffarmen Bedingungen bestimmte Zellbestandteile den Lysosomen zugeführt und dort abgebaut werden (Ravikumar et al., 2010a). Der Begriff „Autophagie“ wurde 1963 von Christian de Duve geprägt, obwohl das Phänomen bereits in den 50er Jahren von verschiedenen Wissenschaftlern beschrieben wurde (De Duve, 1963; Yang and Klionsky, 2010). Durch den Selbstverdau-Mechanismus wird einerseits Energie gewonnen und andererseits die Zelle von überflüssigen oder schädlichen Proteinen und Zellorganellen gereinigt. Autophagie ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, dessen prinzipieller Ablauf sich in einzelligen, wie zum Beispiel Hefepilzen, und Säugerzellen kaum unterscheidet. Im Wesentlichen werden drei Formen der Autophagie voneinander abgegrenzt:

- 1.) *Chaperon-vermittelte Autophagie*: Bestimmte zytosolische Proteine werden durch Chaperonkomplexe erkannt, zu den Lysosomen transportiert und dort über spezifische Rezeptoren zur Degradation aufgenommen (Bandyopadhyay et al., 2008). Diese für den Abbau bestimmten Proteine weisen alle ein gemeinsames Pentapeptid-Motiv in ihrer Aminosäuresequenz (KFERQ) auf, das von einem Komplex aus u.a. hsc70 (heat shock cognate proteins of 70kDa) erkannt wird (Kaushik et al., 2011). Mit Hilfe dieser Chaperone gelangen die aussortierten Proteine zu der Lysosomenmembran und werden dort an den LAMP-2A-Rezeptor (Lysosome-associated membrane protein Typ2A) gebunden, welcher über die Aufnahme der Proteine in die Lysosomen deren eigentlichen Abbau einleitet (Cuervo, 2004).
- 2.) *Mikroautophagie*: Hierbei handelt es sich um einen Abbauvorgang, bei dem lysosomennahe Zytoplasmabestandteile durch Einstülpung der Lysosomenmembran und anschließender Abschnürung eines Vesikels in das Lysosom aufgenommen werden (Li et al., 2012).
- 3.) *Makroautophagie*: Hier wird im Zytosol das abzubauen Zellmaterial von einer Doppelmembran eingeschlossen. Die so entstehenden Autophagosomen verschmelzen daraufhin mit Endosomen und/oder mit Lysosomen, in denen ihr Inhalt schließlich abgebaut wird (Boya et al., 2013). Der Begriff „Makroautophagie“ wird in dieser Arbeit mit dem Begriff „Autophagie“ gleichgesetzt und soll im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

1.1.1 Ablauf der Autophagie

1.1.1.1 Überblick über die Autophagosomenformation

Nach Induktion der Autophagie wird das abzubauenende Zellmaterial von einer Doppelmembran eingeschlossen. Diese entsteht aus einer sogenannten Phagophore, welche sich durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren (siehe Abschnitt 1.1.1.2) solange vergrößert, bis das für den Abbau bestimmte Zellmaterial komplett von der Membran umgeben ist. Das Endprodukt dieses Reifungsprozesses ist das Autophagosom. Dieses verschmilzt anschließend mit einem Lysosom, welches die für den Verdau notwendigen hydrolysierenden Enzyme enthält. Dabei entsteht das Autolysosom, in dem dann der eigentliche Abbau des Autophagosomeninhalts beginnt (Ravikumar et al., 2009). Der detaillierte Vorgang wird hier, soweit nicht anders vermerkt, nur für Säugerzellen beschrieben.

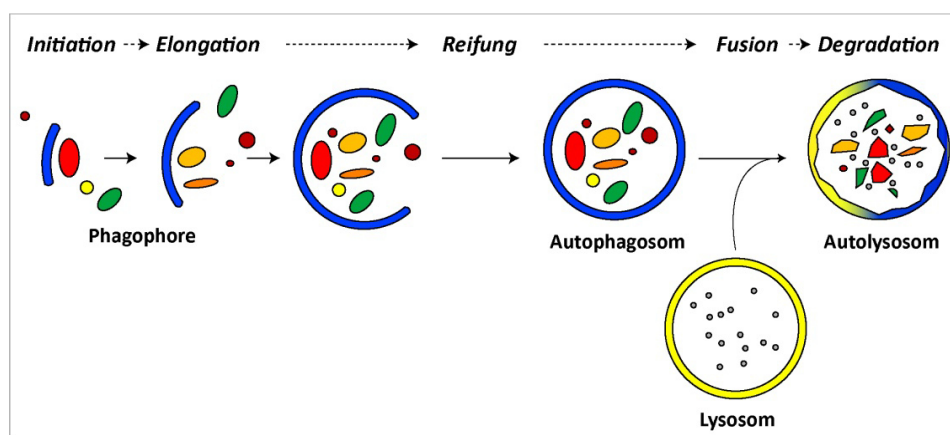


Abbildung 1.1-1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Autophagie. Der autophagische Prozess ist durch die Bildung von Autophagosomen, die das für den Abbau bestimmte Zellmaterial mit einer Doppelmembran umschließen, gekennzeichnet. Durch die Fusion mit einem Lysosom entsteht ein Autolysosom, in dem der eigentliche Abbauvorgang stattfindet. Modifiziert nach (Ravikumar et al., 2010a).

Für den reibungslosen Ablauf der Autophagie ist das präzise Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener Proteine notwendig. Diese Proteine werden als Atg-Proteine bezeichnet und durch entsprechende Autophagie-assoziierte Gene (*Atg*) kodiert. In Hefezellen wurden bereits 36 verschiedene Atg-Gene beschrieben, die größtenteils auch in Säugerzellen in ähnlicher Form und mit analoger Funktion nachgewiesen wurden (Stanley et al., 2014).

1.1.1.2 Bildung und Herkunft der Phagophore

Die im Ablauf der Autophagie morphologisch als erstes nachweisbare autophagische Struktur ist die Phagophore (=Isolationsmembran) (Eskelinen and Saftig, 2009). Die Entstehung und Herkunft dieser

sogenannten Phagophore ist momentan noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass das endoplasmatische Retikulum (ER) der wahrscheinlichste Ursprungsort für die Phagophore ist (Lamb et al., 2013). Einige für die Autophagie essentielle Moleküle (zum Beispiel das Lipid Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PI3P), sowie die Proteine Atg5 und LC3) akkumulieren und reichern sich an kleinen ER-assoziierten, membranösen Strukturen an. Diese PI3P-haltigen Membranabschnitte sind dynamisch mit dem ER verbunden und wurden von ihren Entdeckern als Omegasome bezeichnet (Axe et al., 2008). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Phagophore mit tassenförmigen Ausstülpungen des ER verbunden ist und sich wie in Abbildung 1.1-2 (unten) dargestellt zwischen zwei ER-Zisternen verlängert (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009). DFCP1 (Double-FYVE-containing protein), welches als Markerprotein für Omegasomen identifiziert wurde (Axe et al., 2008), war an den tassenförmigen ER-Strukturen verstärkt nachweisbar (Hayashi-Nishino et al., 2009), was die Hypothese des ERs als Ursprungsort der Phagophore unterstützt. Nach neuesten Erkenntnissen scheint die Autophagosomenformation an speziellen kleinen ER-Abschnitten (MAMs = Mitochondrien-assoziierte ER-Membran), die sich mit der Mitochondrienmembran berühren, abzulaufen (Hamasaki et al., 2013).

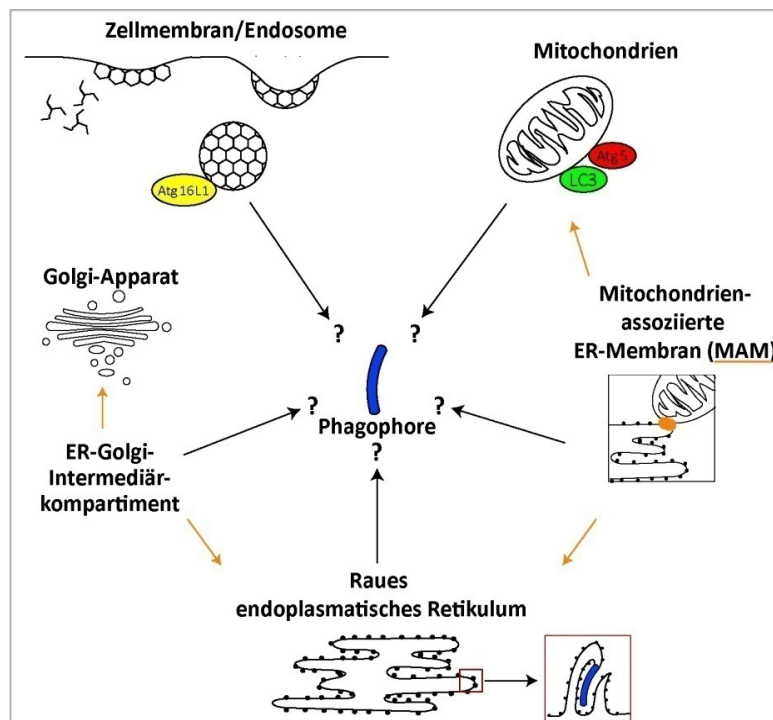


Abbildung 1.1-2: Schematische Darstellung der Herkunft der Phagophore. In Anlehnung an (Tooze and Yoshimori, 2010).

Für die Verlängerung der Phagophore können wahrscheinlich mehrere Zellorganellen als Membranquelle dienen. In diesem Zusammenhang wurde die äußere Mitochondrienmembran

beschrieben, da nach Hungern von Zellen eine Akkumulation von Autophagie-relevanten Proteinen (Atg5 und LC3) an Mitochondrien gesehen wurde und der Mitochondrienmarker YFP-Mito^{cb5}TM auf Autophagosomen nachgewiesen werden konnte (Hailey et al., 2010). Bei einer weiteren möglichen Membranquelle handelt es sich um die Plasmamembran. Es wurde gezeigt, dass das Autophagie-assoziierte Protein Atg16L1 an die schwere Kette des Clathrin-Proteins bindet, welches für die Einstülpung der Plasmamembran im Rahmen der Endozytose eine entscheidende Rolle spielt. Durch Hemmung der Clathrin-vermittelten Membraneinstülpung entstehen weniger Atg16L1-haltige Autophagosomen-Vorläuferstrukturen, die zur Reifung von Autophagosomen beitragen können (Ravikumar et al., 2010b). In Hefezellen wird auch der Golgi-Apparat als mögliche Quelle für die Phagophorenmembran diskutiert (Ohashi and Munro, 2010). In Säugerzellen scheint außerdem das ER-Golgi-Intermediärkompartiment an der Autophagosomenformation beteiligt zu sein (Ge and Schekman, 2014).

1.1.1.3 Initiation der Autophagosomenbildung

Für die Einleitung der Autophagosomenbildung ist die Aktivierung des ULK-Komplexes (UNC-51-like kinase) nötig (Itakura and Mizushima, 2010). Dieser Komplex setzt sich aus der Proteinkinase ULK1 bzw. ULK2, FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa), Atg101 und Atg13 zusammen (Mizushima, 2010; siehe Abb. 1.1-3). Unter nährstoffreichen Bedingungen liegt dieser im Zytosol vor und wird von mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex1) durch Phosphorylierung inhibiert (siehe Abschnitt 1.1.2a). Durch Hungern fällt der hemmende Effekt von mTORC1 auf den ULK-Komplex weg, wodurch sich dieser vom Zytosol an das ER verlagert (Hosokawa et al., 2009). Durch den ULK-Komplex wird ein weiterer für die Autophagosomenbildung essentieller Komplex, der Phosphatidylinositol3-Kinase-Komplex aktiviert (Russell et al., 2013). Dieser besteht aus hVps34, hVps15 (=p150), Beclin1 und Atg14L (Itakura et al., 2008) und wird durch seine Untereinheit Atg14L zum ER gelenkt (Matsunaga et al., 2010). Bei hVPS34 handelt es sich um eine Klasse3-Phosphoinositid3-Kinase (PI3K), die durch Phosphorylierung für die Bildung von PI3P (= PIP3) aus Phosphatidylinositol (PI) verantwortlich ist (Glick et al., 2010). PI3P reichert sich unter nährstoffarmen Bedingungen an kleinen ER-Abschnitten an, die, wie in Abschnitt 1.1.1.2 beschrieben, einen möglichen Ausgangspunkt für die Autophagosomenformation darstellen (Axe et al., 2008) und rekrutiert andere, für die Autophagosomenbildung notwendige Proteine. Dazu gehören WIPI-Proteine (WD-repeat domain phosphoinositide-interacting) und DFCP1 (Grimmel et al., 2015; Lamb et al., 2013). Die WIPI-Proteine scheinen mit Atg2, das zur Verschließung der

Autophagosomenmembran beiträgt, zu interagieren (Velikkakath et al., 2012). DFCP1 dient als Omegasomenmarker, seine Funktionen sind aber noch unklar (Axe et al., 2008).

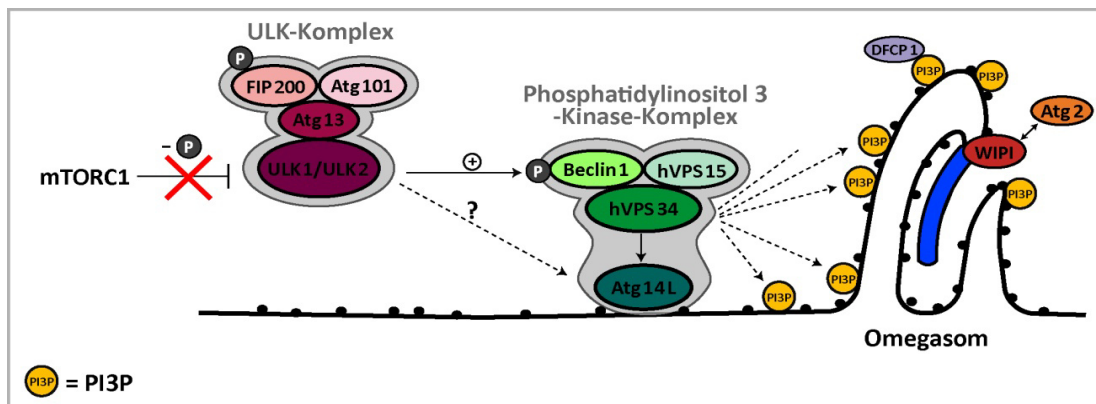


Abbildung 1.1-3: Initiierung der Autophagosomenbildung. Durch Zusammenwirken des ULK-Komplexes und des PI3K-Komplexes kommt es am ER zur Ausbildung von Omegasomen. Die heranwachsende Phagophore ist in blau dargestellt. In Anlehnung an (Lamb et al., 2013).

1.1.1.4 Atg9

Atg9 ist unter den bekannten Autophagie-assoziierten Proteinen das einzige Transmembranprotein (Zavodszky et al., 2013). Die Verteilung von Atg9 innerhalb einer Zelle ist von der Nährstoffsituation abhängig. Atg9 ist unter nährstoffreichen Bedingungen einerseits zellkernnah am Transgolgi-Netzwerk (TGN) und andererseits in der Peripherie an späten Endosomen lokalisiert. Bei Nährstoffentzug findet eine Umverteilung von Atg9 zu Gunsten der Zellperipherie statt (Lamb et al., 2013). Die Lokalisation von Atg9 wird durch den ULK-Komplex und die p38-mitogenaktivierte Kinase (p38 α -MAPK) reguliert (Webber and Tooze, 2010; Young et al., 2006). Mit Hilfe von Bif-1 (Bax-interacting factor-1) wird Atg9 nach Autophagie-Induktion vom TGN in vesikuläre Kompartimente abgegeben, die mit der wachsenden Phagophore und Autophagosomen interagieren. Im Unterschied zu Hefezellen scheint Atg9 in Säugerzellen aber nicht in die Phagophorenmembran eingebaut zu werden (Lamb et al., 2013; Orsi et al., 2012). Die genauen Funktionen von Atg9 sind momentan noch unklar. Es scheint Aufgaben bei der Bildung und dem Wachstum der Phagophore zu erfüllen, indem es vermutlich die benötigten Lipide anliefert (Lamb et al., 2013).

1.1.1.5 Elongation der Isolationsmembran

Die Elongation der Isolationsmembran wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche Reaktionen reguliert (Geng and Klionsky, 2008). Bei der gewöhnlichen Ubiquitynylierung von Proteinen wird zuerst das C-terminale Ende des Ubiquitins unter ATP-Verbrauch aktiviert, indem es über eine Thioesterbrücke an Enzym 1 (E1) gebunden wird. Danach wird das aktivierte Ubiquitin auf das konjugierende Enzym 2

(E2) übertragen und in einem letzten Schritt mit Hilfe eines dritten Enzyms, der E3-Ligase (E3), an das Zielprotein gebunden (Pickart and Eddins, 2004). Im Unterschied zu einer solchen Ubiquitylierungsreaktion, die durch drei Enzyme katalysiert wird, sind für den Konjugationsmechanismus im Rahmen der Elongation nur zwei Enzyme notwendig. In der ersten Ubiquitin-ähnlichen Reaktion wird Atg12 an Atg5 gebunden (Mizushima et al., 1998; Abb. 1.1-4a). Die Rolle des aktivierenden Enzyms (E1) wird hier von Atg7 übernommen. Es bindet über eine Thioesterbrücke mit seinem Cystein-Rest an das C-terminale Glycin des Atg12, wodurch dieses aktiviert wird. Im nächsten Schritt wird das Atg12 auf Atg10 übertragen, welches dem E2 der Ubiquitylierungsreaktion entspricht. Dieses vermittelt die Konjugation von Atg12 an das Zielprotein Atg5 (Geng and Klionsky, 2008; Ravikumar et al., 2010a). Nach Abschluss der Reaktion bildet das entstandene Konjugat einen Komplex mit Atg16L (Mizushima et al., 2003). Atg16L liegt in der Zelle als Homodimer vor, das über helikale Strukturen ausgebildet wird. Es bindet über seine Atg5-Bindungsdomänen nicht-kovalent zwei Atg5-Atg12-Konjugate. Vier der so entstandenen Einheiten lagern sich schließlich zu einem Komplex mit einer Masse von 800 kDa zusammen, dessen Bildung auch unabhängig von Autophagieinduktion stattfindet (Zavodszky et al., 2013). Dieser Komplex lagert sich vorzugsweise an der äußeren Membran der Phagophore an und dissoziiert von dieser sobald die Bildung des Autophagosoms vollständig abgeschlossen ist. Seine Aufgaben bestehen in der Bestimmung des Ortes der LC3-Lipidierung (Zavodszky et al., 2013).

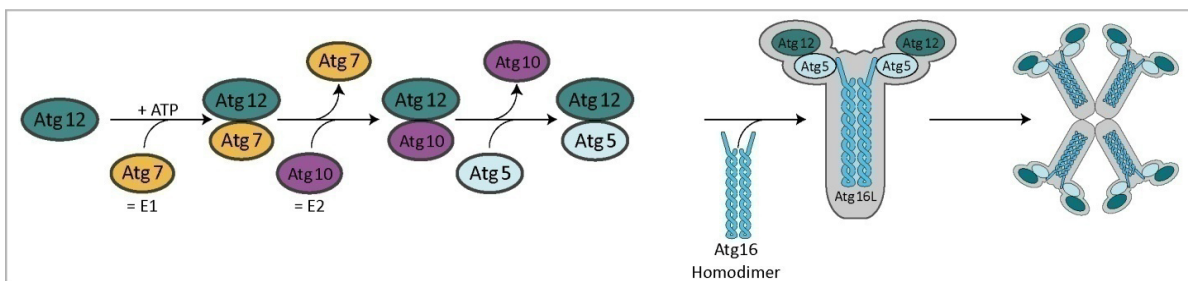


Abbildung 1.1-4a: Darstellung der Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme. In einer ersten Reaktion wird Atg12 auf Atg5 übertragen und bildet anschließend einen Komplex mit Atg16L. In Anlehnung an (Geng and Klionsky, 2008).

Das LC3 stellt eine Komponente der zweiten Ubiquitin-ähnlichen Reaktion dar. LC3 gehört zusammen mit der GABA receptor-associated protein (GABARAP)-Familie zu den Atg8-ähnlichen Proteinen. Beide Untergruppen sind essentiell für die Autophagie, übernehmen aber unterschiedliche Aufgaben (Weidberg et al., 2010). LC3 (= microtubule-associated protein1 light chain3 = MAP1-LC3) wird als Vorläufermolekül (proLC3) gebildet (siehe Abb. 1.1-4b). Bevor es an der Konjugationsreaktion teilnehmen kann, wird durch die Protease Atg4b ein Arginin-Rest an seinem C-terminalen Ende abgespalten (Hemelaar et al., 2003; Kabeya et al., 2000). Das so entstandene Molekül heißt LC3-I und

trägt nun C-terminal einen Glycin-Rest. Wie in der Atg5-Atg12-Konjugationsreaktion übernimmt auch hier Atg7 die Funktion von E1 und aktiviert LC3-I über eine Thioesterbindung. Das aktivierte LC3-I wird dann auf das E2-ähnliche Atg3 übertragen. Zum Schluss erfolgt die Lipidierung, in der LC3-I durch eine Amidbindung mit Phosphatidylethanolamin (PE) verknüpft wird (Kabeya et al., 2000; Tanida et al., 2004). Bei PE handelt es sich um ein Phospholipid, das am Aufbau von Biomembranen beteiligt ist. Es besteht aus einer hydrophilen Kopfgruppe und zwei unpolaren Kohlenwasserstoffschwänzen und wird unter Beteiligung des ERs und der Mitochondrien aus Diacylglycerol gebildet. Der Austausch der Lipidstoffwechsel-Zwischenprodukte wird durch die Anlagerung von Mitochondrien an das ER, an den sogenannten Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAMs) erleichtert (Vance and Tasseva, 2013).

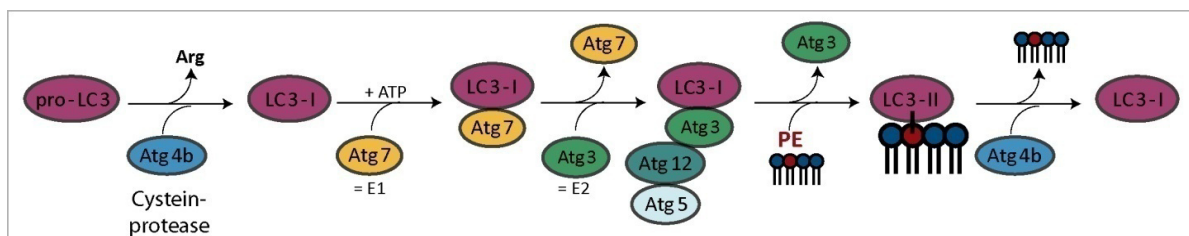


Abbildung 1.1-4b: Darstellung der Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme. In der zweiten Reaktion erfolgt die Lipidierung von LC3 durch PE. In Anlehnung an (Geng and Klionsky, 2008).

1.1.1.6 Reifung und Transport der Autophagosomen und deren Verschmelzung mit Lysosomen

Da die Autophagosomen an verschiedenen Orten in der Zelle entstehen und reifen können (He and Klionsky, 2009), muss ein gerichteter Transport zu den Lysosomen gewährleistet sein. Dieser Autophagosomentransfer orientiert sich an Mikrotubuli und ist zu den Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) gerichtet, da dort Lysosomen vermehrt vorkommen (Fass et al., 2006). Dieser Transportvorgang wird durch das Motorprotein Dynein ermöglicht (Kimura et al., 2008). Auf ihrem Weg verschmelzen die Autophagosomen zum Teil mit späten Endosomen und schließlich mit Lysosomen (Ravikumar et al., 2009).

Für die Fusion werden verschiedene Proteine, wie zum Beispiel ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport), Rab7 (Ras-related in brain), SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) und mehrere Vps-Proteine (Vacuolar protein sorting), die gemeinsam den HOPS-Komplex bilden (homotypic fusion and protein sorting), benötigt (Jiang et al., 2014; Lee et al., 2007). So führt zum Beispiel ein Mangel an ESCRT-Proteinen zu einer Hemmung der Autophagosomenreifung (Lee et al., 2007). Als weiteres für den Reifungsprozess notwendiges Protein wurde UVRAG (UV radiation resistance-associated gene protein) beschrieben. UVRAG ist an der

Rekrutierung der für die Fusion nötigen Proteine beteiligt. Es interagiert mit dem Vps-Komplex der Klasse C, wodurch Rab7 stimuliert wird (Liang et al., 2008). In einem weiteren Komplex interagiert UVRAG hingegen mit Beclin1, hVps34, hVps15 und Rubicon, einem Komplex, der der Autophagosomenreifung entgegenwirkt (Matsunaga et al., 2009; Ravikumar et al., 2010a). Zusätzlich ist für das Gelingen der Verschmelzung mit den Lysosomen auch eine intakte Funktion der Lysosomen notwendig. So wird zum Beispiel durch Hemmung der lysosomalen H⁺-ATPase durch Bafilomycin A1 die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen unterdrückt (Ravikumar et al., 2010a; Yamamoto et al., 1998).

1.1.1.7 Das Lysosom

In den Lysosomen erfolgt der eigentliche Abbau des Zellmaterials, das von den Autophagosomen sequestriert wurde. Lysosomen, die noch kein Abbaumaterial aufgenommen haben, werden als primäre Lysosomen bezeichnet. Verschmelzen sie mit Autophagosomen oder Endosomen, spricht man von sekundären Lysosomen. Lysosomen besitzen viele verschiedene hydrolytische Enzyme, wie zum Beispiel Proteasen, Nukleasen und Lipasen, die für den Abbauvorgang notwendig sind (Boya, 2012). Diese Enzyme können am besten bei einem pH-Wert von 4.5-5 arbeiten. Für die Aufrechterhaltung des sauren pH-Werts ist die membranständige H⁺-ATPase zuständig, die Energie in Form von ATP benötigt (Ishida et al., 2013). Nachdem die abzubauenen Moleküle verdaut wurden, werden die entstandenen Einzelbestandteile durch Permeasen wieder an das Zytoplasma zurückgegeben und stehen für den Zellstoffwechsel erneut zur Verfügung. Unverdauliche Abbaureste in Lysosomen werden Residualkörperchen genannt (Graumann and Sasse, 2004).

1.1.1.8 Die Atg5/Atg7-unabhängige Autophagie

Neben der eben beschriebenen konventionellen Autophagie, wurde auch ein von Atg5 und Atg7 unabhängiger autophagischer Prozess beobachtet (Nishida et al., 2009). Atg5-Knockout-Zellen waren unter Behandlung mit dem Zytostatikum Etoposid gleichermaßen wie Wildtyp-Zellen fähig, elektronenmikroskopisch sichtbare autophagische Strukturen auszubilden. Im Unterschied zu den Wildtyp-Zellen konnte in den Knockout-Zellen aber kein LC3 in der Autophagosomenmembran nachgewiesen werden. Weder der Knockout von Atg5 oder Atg7 als obligatorischer Bestandteil der Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme, noch der von Atg9 verminderten das Ausmaß an Autophagie. Komponenten aus dem ULK-Komplex (ULK1 und FIP200) und dem PI3K-Komplex (Beclin1 und Vps34) scheinen hingegen für diesen Mechanismus von Bedeutung zu sein. Die

physiologische Bedeutung dieses Alternativ-Wegs ist noch unbestimmt (Juenemann and Reits, 2012; Nishida et al., 2009).

1.1.2 Regulation der Autophagie

Um mit Hilfe von Autophagie eine bestmögliche Anpassung an die jeweiligen Umgebungsbedingungen der Zelle ermöglichen zu können, muss der Prozess auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Einige der involvierten Moleküle und Signalwege sollen im Folgenden beschrieben werden.

a) Regulierung des ULK-Komplexes durch mTOR

Bei dem mammalian target of rapamycin (mTOR) handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die verschiedene regulatorische Aufgaben im Zellstoffwechsel erfüllt. Neben der Autophagie reguliert sie die Biogenese von Ribosomen und die Translation von Proteinen (Sarbasov et al., 2005).

In Säugerzellen wurden zwei verschiedene mTOR-Komplexe nachgewiesen (mTORC1 und mTORC2). mTORC1, bestehend aus mTOR, mLST8/gβL (mLST8/g-Protein β-subunit-like Protein), PRAS40 (Proline-rich Akt substrate of 40kDa) und Raptor (regulatory-assoiated protein of mTOR), wird durch Rapamycin destabilisiert, wodurch Autophagie induziert wird. mTORC2 setzt sich aus mTOR, mLST8/gβL, SIN1, Protor und Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) zusammen und ist an der Regulation der Autophagie nicht direkt beteiligt (Ravikumar et al., 2010a).

Unter wachstumsfördernden Bedingungen reguliert mTORC1 den Prozess der Autophagie negativ. Indem es direkt mit dem ULK-Komplex interagiert, vermittelt es über die Phosphorylierung von Atg13 und ULK1 seine hemmende Wirkung (Hosokawa et al., 2009). In nährstoffarmem Milieu hingegen löst sich mTORC1 vom ULK-Komplex, wodurch sein hemmender Einfluss aufgehoben wird. Derselbe Effekt kann auch durch die Behandlung mit Rapamycin, welches mit FKBP12 (FK506-binding-Protein of 12 kDa) einen Komplex bildet, erreicht werden (Shimobayashi and Hall, 2014).

mTORC1 wird durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel dem Ernährungs- und Energiestatus und dem Angebot an Aminosäuren und Wachstumsfaktoren, beeinflusst (Boya et al., 2013).

- **Regulierung von mTORC durch Insulin und Wachstumsfaktoren**

Das Vorhandensein von Insulin und anderen Wachstumsfaktoren unterdrückt Autophagie über eine positive Regulierung von mTOR. Sie aktivieren Rezeptor-Tyrosinkinase, welche über verschiedene Moleküle die Aktivierung der Phosphoinositid3-Kinase bewirken, welche PIP3 erzeugt. Das vermehrte Angebot von PIP3 führt zur Aktivierung von der Proteinkinase B (Akt), welches wiederum den Hamartin-Tuberin-Komplex (TSC1/TSC2) hemmt. Dadurch fällt der stimulierende Einfluss von

TSC1/TSC2 auf die GTPase Rheb (Ras-homolog-enriched-in-brain) weg, weshalb aus Rheb-GTP kein Rheb-GDP gebildet wird. Das anfallende Rheb-GTP wirkt aktivierend auf mTOR (Wang and Levine, 2010; siehe Abb. 1.1-5).

- **Regulierung von mTORC durch Aminosäuren**

Wie Aminosäuren mTORC aktivieren ist noch nicht vollständig verstanden (Meijer and Codogno, 2009). Vor allem das verzweigtkettige Leucin wurde als maßgeblicher Stimulus von mTORC unter den Aminosäuren beschrieben (Christie et al., 2002). Aminosäuren scheinen mTORC unter anderem über Rag-GTPasen, einem Heterodimer aus RagA/B und RagC/D, zu aktivieren (Sancak et al., 2008). Diese binden direkt an mTOR und begünstigen vermutlich die Verbindung von mTOR und Rheb (Wang and Levine, 2010). Auch verschiedene andere Moleküle, wie zum Beispiel Vps34 (Nobukuni et al., 2005), MAPAK3, RalA/B und Rab5 (Bodemann et al., 2011; Kim and Guan, 2011) wurden als Aminosäure-abhängige Aktivatoren von mTORC identifiziert. Ein anderer möglicher Mechanismus funktioniert über das Ausmaß der Beladung von tRNAs mit Aminosäuren. Bei Aminosäuremangel fördern sie die Aktivierung von GCN2 (general control non-derepressible-2) und damit die Phosphorylierung von eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor-2), was letztendlich zur transkriptionellen Hochregulierung von unter anderem verschiedenen Atg-Genen führt (Galluzzi et al., 2014; Wek et al., 1995).

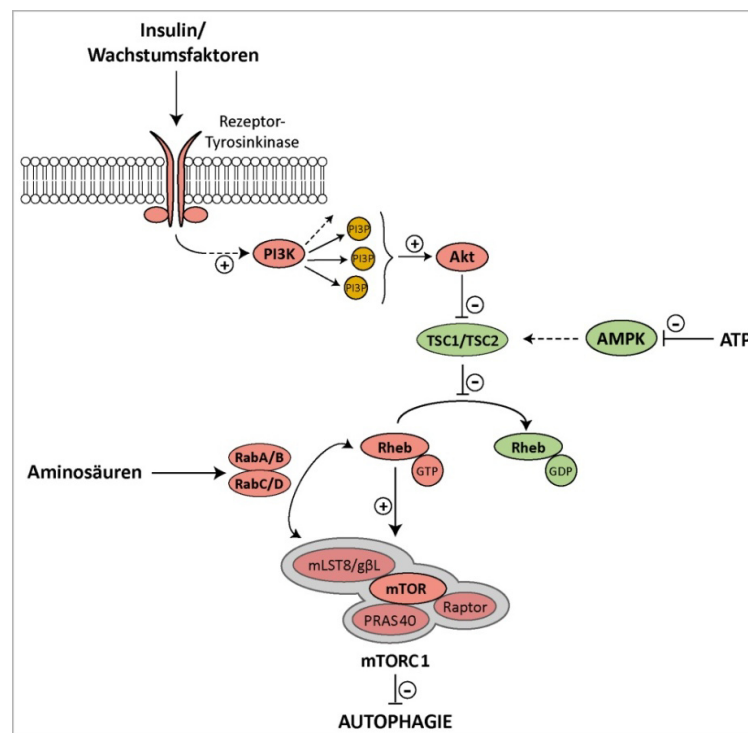


Abbildung 1.1-5: Regulierung des mTOR-Komplexes. Die Anwesenheit von Insulin, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und ATP führt zur Aktivierung von mTORC 1 und somit zur Hemmung der Autophagie.

- **Regulierung von mTORC durch den Energiestatus der Zelle**

Über den AMPK-Signalweg wird Autophagie in Abhängigkeit vom Energiestatus der Zelle stimuliert (Abada and Elazar, 2014). Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) wird durch zelluläre Stressoren, wie zum Beispiel Hypoxie oder Glukosemangel, welche zu einem erhöhtem AMP/ATP- Verhältnis führen, aktiviert (Hardie et al., 2012). Es handelt sich um eine essentielle heterotrimere Kinase, die im angeregten Zustand die Hochregulierung verschiedener Signalwege bewirkt, die die ATP-Produktion stimulieren (Wang and Levine, 2010). Indem die AMPK über die Phosphorylierung von TSC2 zur vermehrten Bereitstellung von Rheb-GDP führt, inhibiert es mTORC1 indirekt und stimuliert somit Autophagie (Inoki et al., 2003). Neben der Hemmung von mTORC ist die AMPK bei Energiemangel auch zur direkten Stimulation des ULK-Komplexes und damit zur positiven Regulierung des autophagischen Prozesses fähig (Boya et al., 2013).

b) Regulierung des PI3K-Komplexes

Auch auf der Ebene des PI3K-Komplexes wird die Autophagie durch die Bindung verschiedener regulatorischer Proteine beeinflusst. Dabei fördern zum Beispiel UVRAG, BIF1, Atg14L und Ambra1 den Prozess, wohingegen Rubicon und Bcl2 hemmend wirken (Glick et al., 2010). Besonders gut untersucht ist die Interaktion zwischen Bcl2 und Beclin1 in Abhängigkeit von der Nährstoffsituation. Bindet Bcl2 an die BH-Domäne von Beclin1, wird zum einen die Interaktion zwischen Beclin1 und Vps34 im PI3K-Komplex behindert und zum anderen die Bindungsaffinität des proautophagischen UVRAG zu Beclin1 vermindert. Beides führt zur Hemmung der Autophagie. Die Interaktion zwischen Bcl2 und Beclin1 kann durch eine Jnk1-vermittelte Phosphorylierung von Bcl2 oder durch BH3-only Proteine, die mit Bcl2 um die BH-Bindedomäne von Beclin1 konkurrieren, unterbunden werden (Zhou et al., 2011).

c) Regulierung der LC3-Aktivität durch Phosphorylierung

Es konnte gezeigt werden, dass LC3 im phosphorylierten Zustand am autophagischen Prozess nicht teilnimmt. Die Phosphorylierung von LC3 erfolgt durch die Proteinkinase A. Durch den Einsatz von Substanzen, die Autophagie induzieren (wie zum Beispiel Rapamycin), kommt es zur Dephosphorylierung von LC3 und seiner Teilnahme am autophagischen Prozess, wobei genauere Mechanismen noch unklar sind (Cherra et al., 2010).

1.1.3 Physiologische Funktionen und klinische Relevanz der Autophagie

Autophagie kann durch eine Vielzahl von metabolischen Stressoren induziert werden. Dazu gehören der Entzug von Hormonen und Wachstumsfaktoren, hohe Temperaturen, Hypoxie, pharmazeutische

Agenzien und allem voran der Mangel an Nahrung (Tukaj, 2013). Durch den Abbau von zellulärem Material trägt die Autophagie zur Bereitstellung von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Lipiden und somit zu einem effizienten Energiehaushalt bei. Auf diese Weise hilft der Prozess den Zellen auf sich ändernde äußere Bedingungen zu reagieren (Singh and Cuervo, 2011). Dabei ist die höchste autophagische Aktivität nach einer Dauer des Hungerzustands von 6-8 Stunden beobachtbar. Vorher dienen vor allem die Proteasomen als Energielieferanten, danach läuft verstärkt die Chaperon-vermittelte Autophagie ab (Singh and Cuervo, 2011). Neben der Adaption an metabolische Stresssituationen erfüllt die Autophagie auch noch verschiedene andere physiologische Funktionen (Yang et al., 2013).

Sie trägt zum Beispiel zur zellulären Qualitätskontrolle bei, da sie an der Beseitigung alter, überflüssiger oder beschädigter Organellen beteiligt ist (Tukaj, 2013). In diesem Zusammenhang wurden kürzlich einige selektive autophagische Mechanismen, durch die bestimmte Organellen spezifisch abgebaut werden, beschrieben. Beispiele hierfür sind Mitophagie (Abbau von Mitochondrien), Pexophagie (Abbau von Peroxysomen) und Ribophagie (Abbau von Ribosomen) (Kraft and Martens, 2012). So wurde in Mäusen mit Autophagie-defizienten Herzmuskelzellen unter anderem eine Aggregation von Mitochondrien, einhergehend mit kardialer Hypertrophie, beobachtet (Nakai et al., 2007). Auch in der Qualitätskontrolle von Proteinen ist die Autophagie involviert, indem sie am Abbau von aggregationsanfälligen Proteinen mitwirkt. Konditionale Atg7-Knockout-Tiere sind durch eine Anhäufung von ubiquitinierten Proteinaggregaten in der Leber aufgefallen (Komatsu et al., 2005). Auch einige neurodegenerative Erkrankungen gehen mit der Akkumulation solcher Proteinaggregate in den betroffenen Hirnregionen einher. Zu diesen Krankheiten zählen unter anderem der Morbus Parkinson, der Morbus Alzheimer, die Chorea Huntington sowie die amyotrophe Lateralsklerose (Menzies et al., 2015). Im Umkehrschluss konnte auch gezeigt werden, dass ein Anheben der Autophagie die Beseitigung der Proteinaggregate verbessert und zu einem teilweisen Rückgang der Symptome führte (Eskelinen and Saftig, 2009; Sarkar et al., 2007).

Weiterhin wird die Zellreifung und Differenzierung durch Autophagie beeinflusst. Dabei scheint der autophagische Prozess zu zwei Entwicklungszeitpunkten eine besonders wichtige Rolle zu spielen. Ein kritischer Zeitpunkt ist unmittelbar nach der Befruchtung der Oozyte. Es wurde beobachtet, dass Oozyten-spezifische Atg5-Knockout-Mäuse während der Embryogenese zwischen dem 4-Zell- und dem 8-Zellstadium verstarben (Mizushima and Levine, 2010; Tsukamoto et al., 2008). Auch in der Periode unmittelbar nach der Geburt, mit dem Wegfall der mütterlichen Nährstoffversorgung über die Plazenta, ist die Autophagie zur Energieproduktion überlebenswichtig. Autophagie-defiziente

Mäuse verhungerten innerhalb eines Tages nach der Geburt (Kuma et al., 2004; Mizushima and Levine, 2010).

Auch bei der Immunabwehr im Rahmen von infektiösen Prozessen spielt die Autophagie eine wichtige Rolle. So stellt der autophagische Prozess einen Schutzmechanismus gegenüber verschiedenen intrazellulären Pathogenen dar. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass bei einer Herpes-Simplex-Infektion Autophagie induziert wird und das die Viren einen Virulenzfaktor (ICP34,5) tragen, der sie vor der Abwehr durch Autophagie beschützt (Eskelinen and Saftig, 2009). Auch gegen bakterielle Infektionen kann Autophagie schützen, indem beispielsweise A-Streptokokken sequestriert und eliminiert werden (Nakagawa et al., 2004).

Eine noch nicht vollständig verstandene Doppelrolle scheint die Autophagie im Rahmen der Zytoprotektion zu spielen (Tukaj, 2013). Einerseits wird sie vor allem als Schutzmechanismus gegenüber zellulären Stressoren verstanden, andererseits kann der Prozess bei Überlastung des autophagischen Systems aber auch zum Zelltod führen (Shintani and Klionsky, 2004). In diesem Zusammenhang wird auch von autophagischem Zelltod gesprochen. Dieser Prozess ist morphologisch durch Akkumulation von autophagischen Vakuolen im großen Umfang gekennzeichnet und läuft Caspase-unabhängig und ohne die typischen Apoptosemerkmale wie zum Beispiel Kernkondensation und -fragmentation ab (Kroemer and Levine, 2008).

Desweiteren fördert ein gestörter Ablauf der Autophagie die Entwicklung von Tumoren (Eskelinen and Saftig, 2009). Für eine Reihe von Brust- und Ovarialkarzinomen wurde gezeigt, dass das für die Autophagie essentielle Beclin1-Gen monoallelisch fehlt und dass in umgekehrter Weise eine Überexpression von Beclin1 die Karzinogenese hemmt (Liang et al., 1999; Yang et al., 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei fehlerhaft ablaufender Autophagie, die Akkumulation von Proteinaggregaten und geschädigten Organellen zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und damit verbundenen DNA-Schäden mit resultierender genomischer Instabilität führt (Mathew et al., 2009; Yang et al., 2011). In fortgeschrittenen Tumorstadien scheint die Autophagie allerdings einen gegensätzlichen Effekt auf das Tumorwachstum zu haben (Eskelinen and Saftig, 2009). Sie begünstigt die Stresstoleranz von Tumoren und unterstützt das verstärkte Tumorwachstum durch die Bereitstellung von Energiequellen (Degenhardt et al., 2006; Yang et al., 2011). Im Unterschied zu Tumorzellen mit einer regelhaft ablaufenden Autophagie fielen Autophagie-defiziente Tumorzellen durch eine verminderte Überlebensdauer auf (Mathew et al., 2009). Aus diesen Beobachtungen wird derzeit versucht, einen therapeutischen Nutzen ziehen, indem der Effekt von Autophagie-Hemmstoffen in Kombination mit Chemotherapeutika in der Krebstherapie überprüft wird (Rebecca and Amaravadi, 2015).

Es gibt viele weitere Erkrankungen, wie zum Beispiel vakuoläre Myopathien, Morbus Crohn, Autoimmunerkrankungen, lysosomale Speicherkrankheiten und Lebererkrankungen, die mit einer fehlerhaft ablaufenden Autophagie assoziiert sind (Tukaj, 2013), die hier aber nicht im Detail besprochen werden können.

1.2 Der Transkriptionsfaktor Miz1

1.2.1 Strukturelle Eigenschaften

1997 wurde Miz1 (Myc-interacting Zinkfinger protein 1) mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als Bindungspartner von c-Myc, einem in vielen humanen Tumoren deregulierten Protoonkogen, identifiziert (Eilers and Eisenman, 2008; Peukert et al., 1997a; Abb. 1.2-1). Sequenzanalysen zeigten, dass es sich um ein Zinkfingerprotein, das aus 803 Aminosäuren besteht, handelt. Miz1 trägt 13 Zinkfinger, von denen 12 in der C-terminalen Hälfte des Proteins sehr dicht beieinander liegen. Der dreizehnte Zinkfinger ist von diesen durch eine α -helikale Zwischenstruktur, über die Miz1 mit Myc interagieren kann, getrennt (Peukert et al., 1997a). Zinkfingerproteine bilden durch den Einbau von Zinkatomen fingerförmige Strukturen, über die sie an DNA oder RNA binden und als Transkriptionsfaktoren wirken können (Christen and Jaussi, 2004). Neben den 13 Zinkfingern weist Miz1 an seinem N-terminalen Ende noch eine BTB/POZ-Domäne (poxvirus and zinc finger/bric-à-brac, tramtrack and broad complex) auf (Peukert et al., 1997a). Eine BTB/POZ-Domäne konnte in etwa 40 Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (Stead et al., 2007; Stogios et al., 2005). Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren spielen bei der Proliferation und Entwicklung von Zellen, sowie in verschiedenen Krebsarten eine Rolle (Kelly and Daniel, 2006). Aufgabe dieser BTB/POZ-Domäne ist es, die Homooligomerisierung von Miz1 zu einem Tetramer zu vermitteln, die für seine Funktion als Transkriptionsfaktor essentiell ist. Dabei erfolgt die Homodimerisierung durch Interaktion von α -Helices, die Tetramere entstehen durch Wechselwirkungen ihrer β -Faltblattstrukturen (Stead et al., 2007). Zusätzlich wird die POZ/BTB-Domäne zur Rekrutierung spezifischer anderer Bindungspartner benötigt (Stead et al., 2007).

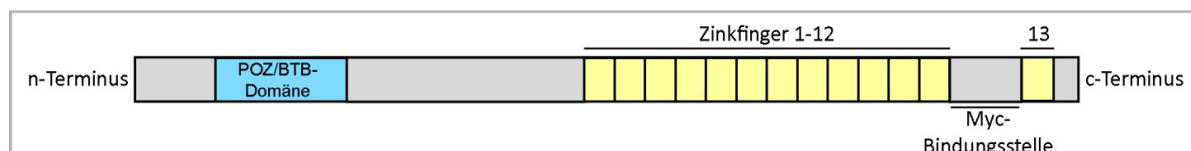


Abbildung 1.2-1: Schematische Darstellung des Miz1-Proteins.

Um die Funktionen von Miz1 genauer untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell entwickelt, indem die POZ/BTB-Domäne-kodierende Sequenz mit loxP-sites flankiert ist und mit Hilfe einer Cre-Rekombinase ausgeschnitten werden kann (Gebhardt et al., 2007).

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften von Miz1

Während der Embryogenese wird Miz1 ubiquitär exprimiert und scheint eine entscheidende Rolle im Entwicklungsprozess zu spielen, da Mäuse mit einem Knockout des kompletten Miz1-Gens den Entwicklungstag 7.5 nicht überleben (Adhikary et al., 2003). Auch in verschiedenen anderen Entwicklungsphasen, wie zum Beispiel der Reifung von B- und T-Lymphozyten (Möröy et al., 2011), der Morphogenese von Haarfollikeln (Gebhardt et al., 2007), oder während der Differenzierung der Brustdrüse (Sanz-Moreno et al., 2014) kommt dem Transkriptionsfaktor eine essentielle Bedeutung zu. Neben seinen Funktionen im Rahmen der Entwicklung, trägt Miz1 außerdem zur Aufrechterhaltung des Myelinisierungsstatus von Schwann-Zellen bei (Sanz-Moreno et al., 2015).

Im Unterschied zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren, die eine POZ/BTB-Domäne enthalten, kommt das Miz1-Protein nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytosol vor (Peukert et al., 1997a) und erfüllt, je nach Lokalisation, verschiedene Aufgaben.

1.2.2.1 Transkriptionsregulierung durch Miz1

Im Zellkern wirkt Miz1 als Transkriptionsfaktor und kann Gene sowohl unabhängig, als auch im Zusammenspiel mit Myc oder anderen Proteinen regulieren (Herkert and Eilers, 2010). Die DNA-Sequenzen, an die Miz1 dabei bindet, wurden kürzlich identifiziert. Sie befinden sich nahezu ausschließlich im Kernbereich der Promotoren verschiedener Gene (Wolf et al., 2013). In Fibroblasten bindet Miz1 an insgesamt 6876 Promotoren, von denen 4985 ebenfalls von Myc gebunden werden (Walz et al., 2014). Freies Miz1 bewirkt die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Gene, wobei es sich die beiden Koaktivatoren p300 und Nucleophosmin (Npm1) zur Hilfe nimmt (Staller et al., 2001; Wanzel et al., 2008, Abb. 1.2-2). Es handelt sich vor allem um Gene, die für den Zellzyklusarrest, für die Differenzierung und für die Reaktion auf DNA-Schäden eine wichtige Rolle spielen (Stead et al., 2007). Ist neben Miz1 allerdings auch noch der Myc/Max-Komplex anwesend, wird die Expression vieler dieser durch Miz1 aktivierten Gene unterdrückt. In diesem Falle bindet Myc über seine HLH-Domäne an Miz1 und führt zu einer Umkehr der transkriptionellen Eigenschaften von Miz1. Die hemmende Wirkung dieses Komplexes wird durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Zum Beispiel werden durch die Bindung von Myc die Koaktivatoren von Miz1 verdrängt. Myc konkurriert

beispielsweise mit der Histonacetyltransferase p300 um sich überlappende Bindungsstellen auf dem Miz1-Protein, wodurch der transkriptionsfördernde Effekt von p300 abgeschwächt wird (Staller et al., 2001). Die Regulierung des Koaktivators Nucleophosmin durch Myc erfolgt indirekt, indem Myc die Expression eines Gens, das für das ribosomale Protein L23 kodiert, stimuliert. L23 ist fähig, Nucleophosmin im Nukleolus zurückzuhalten und kann dadurch seine Interaktion mit Miz1 verhindern (Wanzel et al., 2008). In einem trimeren Komplex zusammen mit dem Tumorsuppressorprotein Arf (alternate reading frame) können Miz1 und Myc die Heterochromatinbildung induzieren (Abb. 1.2-2). Die Bindung von Arf an Miz1 führt zu einer starken Zunahme von Histon H3-trimethyliertem Lysin9, welches wiederum durch verstärkte Kondensierung des Chromatins die Expressionshemmung der auf diesem Abschnitt liegenden Gene bewirkt (Herkert et al., 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Myc/Miz1-Komplex an der Rekrutierung der DNA-Methyltransferase Dnmt3a zu bestimmten Promotoren beteiligt ist. Dnmt3a führt zur Methylierung der Nukleotidbase Cytosin und dadurch zu einer schlechteren Zugänglichkeit der DNA für die an der Transkription beteiligten Enzyme (Brenner et al., 2005). Desweiteren scheint Myc auch durch die Rekrutierung der Histondeacetylase HDAC3 die Genexpression reprimieren zu können. Durch die Aktivität der HDAC3 geht die Acetylierung von Histon H4 verloren, wodurch sich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Histonen und der DNA verstärken (Kurland and Tansey, 2008, Abb. 1.2-2). Ob für diesen Mechanismus ebenfalls eine Interaktion zwischen Myc und Miz1 notwendig ist, wurde noch nicht geklärt (Wiese et al., 2013).

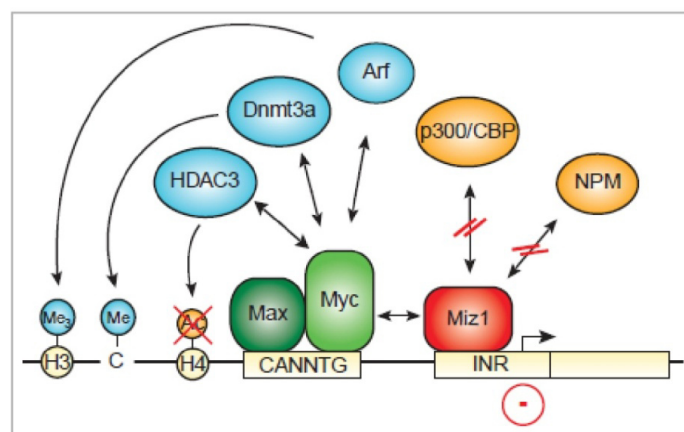


Abbildung 1.2-2: Hemmung der Genexpression durch Interaktion von Miz1 mit dem Myc/Max-Komplex. Durch die Interaktion von Miz1 mit Myc/Max und Arf wird die Expression verschiedener Gene gehemmt, indem zum Beispiel die Koaktivatoren p300 und NPM von Miz1 verdrängt und Histondeacetylasen (HDAC3), sowie DNA-Methyltransferasen (Dnmt3a) aktiviert werden. Entnommen aus (Herkert and Eilers, 2010).

Miz1 kann neben Myc jedoch auch noch mit anderen Proteinen interagieren, um eine Transkriptionsrepression zu bewirken. Dazu gehören zum Beispiel das Protoonkogen Bcl6 (B-

cell lymphoma 6) (Phan et al., 2005), sowie der Transkriptionsfaktor Zbtb4 (zinc finger and BTB domain-containing protein 4) (Weber et al., 2008).

1.2.2.2 Zielgene und damit verbundene Funktionen von Miz 1

Zu den am gründlichsten erforschten von Miz1 und Myc regulierten Zielgenen gehören *CDKN2b* (kodiert für p15^{Ink4b}) und *CDKN1a* (kodiert für p21^{cip1}). In beiden Fällen handelt es sich um Gene, die für Zellzyklus-Inhibitoren kodieren und somit Zellzyklusarrest begünstigen (Wiese et al., 2013). Miz1 bindet dabei direkt an ihre Promotoren. Zusammen mit dem Koaktivator p300 induziert Miz1 die Expression von *CDKN2b* und wirkt dadurch als Proliferationshemmer. Durch Interaktion mit Myc hingegen wird p300 verdrängt und der neu entstandene Komplex hebt die proliferationsinhibierende Wirkung auf (Staller et al., 2001). Dieser Mechanismus scheint besonders bei der durch TGF- β vermittelten Wachstumshemmung wichtig zu sein, die durch die Überexpression von Myc überwunden werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass bei Überexpression einer Myc-Mutante, in der Myc nicht mehr an Miz1 bindet, ein durch TGF- β induzierter Zellzyklusarrest nicht überwunden werden kann. Das bedeutet, dass Myc seine proliferationsfördernden Eigenschaften durch Inhibierung von p15^{Ink4b} nur durch Interaktion mit Miz1 vermitteln kann (Gebhardt et al., 2006). In ähnlicher Weise wirkt Miz1 bzw. Miz1/Myc auf die Expression von p21^{cip1}. In diesem Zusammenhang wurde auch TopBP1 (Topoisomerasell binding protein) als ein Repressor von Miz1 entdeckt. Als Reaktion auf UV-Strahlung wird die Expression von TopBP1 gehemmt, wodurch Miz1 von TopBP1 befreit wird und als Transaktivator des *CDKN1a* Promotors wirken kann. Durch Bindung von Myc an Miz1 wird auch hier der transaktivierende Effekt von Miz1 aufgehoben und der Zellzyklusarrest überwunden (Herold et al., 2002). Es wurde auch beobachtet, dass der Miz1/Myc-Komplex einen negativen Einfluss auf die durch p53-stimulierte p21^{cip1} Expression als Antwort auf DNA-Schäden hat (Seoane et al., 2002). In durch TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) induzierten Hautpapillomen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Miz1 notwendig ist, damit Myc seinen inhibierenden Einfluss auf den Zellzyklusarrest ausüben kann. Mäuse mit einem konditionalen Miz1/POZ-Knockout in Keratinozyten entwickelten unter TPA-Behandlung weniger Hauttumore als Kontrolltiere (Hönnemann et al., 2012). Neben der Expression der beiden genannten Gene, werden durch den Komplex auch noch andere Zellzyklus-Inhibitoren, wie zum Beispiel *CDKN2c* (kodiert für p18Ink4c), *CDKN1b* (kodiert für p27Kip1) und *CDKN1c* (kodiert für p57Kip2) negativ reguliert (Herkert and Eilers, 2010).

Zu einer weiteren Zielgruppe des Miz1/Myc-Komplexes gehören Gene, die für Zelladhäsionsmoleküle kodieren. Durch Interaktion zwischen Miz1 und Myc wird die Expression einiger

Zelladhäsionsproteine gehemmt. Dabei bindet der Komplex in Keratinozyten zum Beispiel an die Promotoren der Gene die für die Integrine $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ kodieren. Durch den Verlust der Integrine lösen sich die Zellen von der Basalmembran ab und ihre Differenzierung wird eingeleitet (Gebhardt et al., 2006).

Außerdem wird die Expression von Bcl2 durch Miz1 und Myc reguliert. Bei Bcl2 handelt es sich um ein Protoonkogen aus der Bcl2-Familie, welche maßgeblich an der Regulierung der Apoptose beteiligt ist. Zu dieser Familie gehören sowohl Proteine mit pro- als auch mit antiapoptotischer Wirkung, wobei Bcl2 selbst zu der letzteren Gruppe gehört. Auch in diesem Falle wird die Expression des Gens durch Miz1 und Myc antagonistisch reguliert. Myc reguliert Bcl2 negativ indem es an das transkriptionsfördernde Miz1 bindet und es inaktiviert (Patel and McMahon, 2007a). Wie in Abschnitt 1.1.2 bereits erwähnt, gehört Bcl2 auch zu den Inhibitoren der Autophagie.

Kürzlich wurden im Zusammenhang mit der Identifikation der Miz1-Bindungsmotive weitere direkte Zielgene von Miz1 beschrieben. Dabei handelt es sich um Gene, die unter anderem Autophagie, Endozytose und den vesikulären Transport beeinflussen (Sanz-Moreno et al., 2014; Wolf et al., 2013). Sie kodieren beispielsweise für Ambra1, Pikfyve, Exoc2 und Vamp4. Ambra1 stimuliert durch Bindung an Beclin1 die Autophagie (siehe Abschnitt 1.1.2b). Pikfyve wird bei der Autolysosomenreifung gebraucht (Rusten et al., 2007). Exoc2 wird als Teil des Exozyst-Komplexes durch RalA/B reguliert und hemmt mTORC1 (Bodemann et al., 2011; Martin et al., 2014). Vamp4 wirkt als Protein der SNARE-Familie an intrazellulären Membranfusionen mit und reichert sich nach Induktion von Autophagie zusammen mit LC3 in Phagosomenmembranen an (Chen and Scheller, 2001; Shui et al., 2008). Durch eine fehlerhaft ablaufende Autophagie wurde der Phänotyp von Mäusen mit POZ-Domäne-Knockout im Cerebellum erklärt (Wolf et al., 2013). Diese Mäuse zeigten neben einer Bradykinase typische Kleinhirnsymptome, wie Tremor und Ataxie, einhergehend mit degenerativen Veränderungen im Cerebellum in Form einer Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen und p62 (Wolf et al., 2013). Außerdem konnte in Mäusen gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von Miz1 während der Schwangerschaft zu einem Laktationsdefekt der Brustdrüse mit einer vorübergehenden Verminderung von Drüsengewebe führt (Sanz-Moreno et al., 2014a). Auch dieser Phänotyp wurde mit einer verringerten Expression von Genen, die mit Autophagie und vesikulärem Transport assoziiert sind, begründet. Vermutlich hat der eingeschränkte intrazelluläre Transport die ebenfalls beobachtete verminderte Expression des Prolaktin-Rezeptors (PrIR) in der Plasmamembran und von ErbB4 (V-Erb-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 4) im Nukleus zur Folge (Sanz-Moreno et al., 2014). Beide Moleküle spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Stat5-Signalkaskade, welche die Proliferation und Differenzierung von

Brustdrüsengewebe fördert (Hennighausen and Robinson, 2008). Diese Zielgene von Miz1, die mit Autophagie, vesikulärem Transport und Endozytose assoziiert sind, werden vermutlich unabhängig von Myc reguliert (Wolf et al., 2013).

Definitiv von Myc unabhängig reguliert Miz1 die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten im Rahmen der erworbenen Immunabwehr (Möröy et al., 2011). In B- und T-Zellen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Miz1 die Expression von *SOCS1* hoch- und die von *Bcl2* herunterreguliert ist. Dieser Zustand führt dazu, dass der normalerweise durch Interleukin 7 aktivierte JAK-STAT-Signalweg unterdrückt wird und STAT-Proteine im Zellkern nicht mehr an der Regulierung von Genen, die für die Lymphozyten-Differenzierung wichtig sind, mitwirken können (Kosan et al., 2010; Saba et al., 2011).

1.2.2.3 Funktionen von Miz1 im Zytoplasma

Im Unterschied zu den transkriptionsregulatorischen Aufgaben von Miz1 im Zellkern ist über seine Funktion im Zytoplasma vergleichsweise wenig bekannt. Eine seiner zytosolischen Aufgaben besteht darin, die von TNF α abhängige Aktivierung von Jnk1 (c-Jun N-terminalen Kinase 1) zu hemmen, indem es die Polyubiquitinierung von TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) verhindert. TRAF2 ist mit dem TNF-Rezeptor assoziiert. In Abwesenheit von Miz1 wird es nach Stimulation durch TNF α polyubiquitinyliert und bewirkt in diesem Zustand die Aktivierung von Jnk1. Aktiviertes Jnk1 wiederum fördert Apoptose, Entzündung und Tumorgenese (Liu et al., 2009). Weiterhin wurde eine Assoziation von Miz1 mit Mikrotubuli beobachtet (Peukert et al., 1997a; Ziegelbauer et al., 2001). Die Zugabe von T113242, einem Agens, das die Depolymerisierung von Mikrotubuli induziert, führt zu einer Verlagerung von Miz1 vom Zytoplasma in den Zellkern (Ziegelbauer et al., 2001). Wie Miz1 dabei in den Zellkern gelangt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Da es keine Kernlokalisationssequenz aufweist, wird es vermutlich zusammen mit Shuttlemolekülen in den Zellkern importiert. Ein solches Shuttlemolekül könnte zum Beispiel Myc sein, da in Anwesenheit von Myc Miz1 vor allem im Kern und in Abwesenheit von Myc vorwiegend im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte (Peukert et al., 1997a).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein Knockout der Miz1/POZ-Domäne in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs für mouse embryonic fibroblasts) sowohl auf morphologischer, als auch auf Genexpressionsebene den autophagischen Prozess beeinflusst (Berliner, 2012; Oppenheimer, 2009; Müller, 2008). Elektronenmikroskopisch zeigten die Miz1/POZ-Domäne-Knockout MEFs (=POZ-Zellen) einen Defekt in der Reifung autophagischer Vakuolen (Berliner, 2012). In immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde eine mangelnde Ausbildung größerer Lysosomen, sowie eine verminderte Ausbildung von Autophagosomen in Zellen mit fehlender Miz1/POZ-Domäne bei Aminosäureentzug beobachtet (Oppenheimer, 2009). Sowohl mit Hilfe der semiquantitativen PCR, als auch der *Real Time* PCR wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen POZ-Zellen und Wildtyp-Zellen (=WT-Zellen) festgestellt (Müller, 2008; Berliner, 2012; Oppenheimer, 2009). Zusätzlich wurde beobachtet, dass unter nährstoffarmen Bedingungen die Expression von Miz1 in WT-Zellen induziert wird, was für die Relevanz des Transkriptionsfaktors für den autophagischen Prozess spricht (Berliner, 2012; Oppenheimer, 2009). Auch in zwei kürzlich erschienenen Publikationen wurden Zusammenhänge zwischen Miz1 und der Autophagie bestätigt (Sanz-Moreno et al., 2014b; Wolf et al., 2013). Da aber die POZ-Zellen und die WT-Zellen parallel immortalisiert wurden, sind diese Ergebnisse leider nur eingeschränkt vergleichbar.

In dieser Arbeit soll nun der Einfluss von Miz1 auf die Autophagie in einem anderen, besser vergleichbaren Zellmodell untersucht werden. Zuerst soll der Einfluss der Autophagiestimulation auf die Expression von Miz1 und seinem Bindungspartner Myc in der Brustdrüsenzelllinie HC11 reproduziert und der zeitliche Verlauf genauer analysiert werden. Um die Bedeutung von Miz1 für die Autophagie genauer untersuchen zu können, sollen HC11-Zellen mit verschiedenen Vektoren infiziert werden. Es handelt sich um Vektoren, die einen Knockdown von Miz1, die Überexpression von Miz1 und die von Myc, sowie die Überexpression einer Myc-Mutante, die nicht an Miz1 binden kann, vermitteln. Mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper gegen LC3 soll in diesen infizierten Zellen, die Fähigkeit zur Autophagosomenbildung überprüft werden. Dazu sollen die Zellen in EBSS gehungert und mit Zellen, die in normalem Nährmedium gewachsen waren, verglichen werden. Zur Verstärkung der autophagischen Effekte sollen außerdem lysosomale Inhibitoren zum Einsatz kommen, die den autophagischen Fluss unterbrechen und zu Akkumulation von Autophagosomen führen (Klionsky et al., 2008a). Nach demselben Prinzip behandelte Zellen sollen anschließend auch elektronenmikroskopisch und auf Genexpressionsebene untersucht werden. Ein weiteres Ziel dieser

Arbeit besteht darin, eine Zelllinie herzustellen, die GFP-markiertes LC3 überexprimiert, um daran Echtzeitanalysen des Miz1-Einflusses auf den autophagischen Prozess durchführen zu können. Um einen möglichst effizienten Knockdown von Miz1 erreichen zu können, soll außerdem eine MEF-Zelllinie etabliert werden, in der die POZ-Domäne auf dem *Miz1*-Gen von LoxP-Sites flankiert ist und mit Hilfe einer induzierbaren Cre-Rekombinase auf Wunsch ausgeschnitten werden kann. Diese Zellen sollen dann verwendet werden, um die in den Vorarbeiten festgestellten Unterschiede bezüglich der Autophagie zu bestätigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<ul style="list-style-type: none"> • Autoklaven <ul style="list-style-type: none"> ○ 5075 EL ○ 5075 ELV ○ Heraeus ST5042 	Tuttnauer, Niederlande Tuttnauer, Niederlande Heraeus, Hanau																
<ul style="list-style-type: none"> • Blotkammer PerfectBlue Semidry Elektroblotter 	Peqlab, Erlangen																
<ul style="list-style-type: none"> • Elektrophorese-Zubehör 	Von Keutz, Reiskirchen																
<ul style="list-style-type: none"> • Fotokameras <ul style="list-style-type: none"> ○ Canon EOS 450 D ○ Fujifilm Finepix JZ300 	Canon, Krefeld Fujifilm Corporation, Japan																
<ul style="list-style-type: none"> • Heizblock Techne Dri-Block DB-2A 	Techne, Großbritannien																
<ul style="list-style-type: none"> • Inkubatoren <ul style="list-style-type: none"> ○ NuAire, DH Autoflow, CO₂Air-Jacketed Incubator ○ CO₂-Brutschrank, Bakterienkultur ○ Schüttelinkubator ○ Heidolph Unimax 1010/Heidolph Inkubator 1000 	Integra, Fernwald Memmert, Rabenau-Londorf New Brunswick Scientific, USA MAGV GmbH, Rabenau																
<ul style="list-style-type: none"> • Magnetrührer Typ Heidolph MR2002 	MAGV GmbH, Rabenau																
<ul style="list-style-type: none"> • Mikroskope <ul style="list-style-type: none"> ○ Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 61 <table border="1" data-bbox="529 1240 1050 1534"> <thead> <tr> <th>Filtersystem</th> <th>MNU2 (UV)</th> <th>MNIB (Alexa 488)</th> <th>NNG (Alexa 546)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Anregungsfilter</td> <td>360-370 nm</td> <td>470-490 nm</td> <td>530-540 nm</td> </tr> <tr> <td>Emissionsfilter</td> <td>420 nm</td> <td>510 nm</td> <td>590 nm</td> </tr> <tr> <td>Dichronischer Strahlenteiler</td> <td>400 nm</td> <td>505 nm</td> <td>570 nm</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> ○ Phasenkontrastmikroskop Zeiss IM 35 ○ Transmissionselektronenmikroskop EM 109 	Filtersystem	MNU2 (UV)	MNIB (Alexa 488)	NNG (Alexa 546)	Anregungsfilter	360-370 nm	470-490 nm	530-540 nm	Emissionsfilter	420 nm	510 nm	590 nm	Dichronischer Strahlenteiler	400 nm	505 nm	570 nm	Olympus, Hamburg Zeiss, Jena Zeiss, Jena
Filtersystem	MNU2 (UV)	MNIB (Alexa 488)	NNG (Alexa 546)														
Anregungsfilter	360-370 nm	470-490 nm	530-540 nm														
Emissionsfilter	420 nm	510 nm	590 nm														
Dichronischer Strahlenteiler	400 nm	505 nm	570 nm														
<ul style="list-style-type: none"> • Mikrowelle 	Privileg																
<ul style="list-style-type: none"> • Netzgeräte <ul style="list-style-type: none"> ○ Power Pack P 25 ○ 2301 Macrodrive 1, Power Supply 	Biometra, Göttingen LKB Bromma, Schweden																
<ul style="list-style-type: none"> • Plattenreader Infinite™ 200 	Tecan, Crailsheim																
<ul style="list-style-type: none"> • Plattenschweißgerät ALPS 50 V Microplate Heat Sealer 	Thermo Scientific, Karlsruhe																

• pH-Meter	WTW pH 521	WTW, Weilheim
• Photometer	Spektralphotometer Hitachi U-2000	Colora, Lorch
• qRT-PCR-Gerät	Stratagene Mx3005P	Agilent, USA
• Reinstwasser-anlage	Elix® UV5	Millipore, Eschborn
• Folien-schweißgerät	Vacupack plus F380	Krupps, Solingen
• Sterilbank	Faster BHA48	Faster, Italien
• Thermocycler	<ul style="list-style-type: none"> ○ Personal Cycler UNO-Thermoblock ○ Peqstar 96 Universal 	Biometra, Göttingen Peqlab, Erlangen
• Trocken-/Wärmeschrank	<ul style="list-style-type: none"> ○ FD 240 ○ Universalschrank 	Binder, Tuttlingen Memmert, Rabenau-Londorf
• UV-Transilluminator	IBI UVT 400-M	Ibi Scientific, USA
• Vortexer	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Bruchsal
• Waagen	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sartorius Typ 1474 ○ Sartorius Analytic AC2105 	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
• Wasserbad	GFL Typ 1004	GFL, Burgwedel
• Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kühlzentrifuge 3K30 ○ Kühlzentrifuge 5810R ○ Kühlzentrifuge J2-21 ○ Tischzentrifuge Rotilabo®-Microcentrifuge ○ Tischzentrifuge Biofuge pico 	Sigma, Osterode am Harz Eppendorf, Hamburg Beckmann, USA Roth, Karlsruhe Haraeus, Hanau

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

• Deckgläser	24x50 mm	Menzelgläser, Braunschweig
• Glaspipetten	1, 2, 5,10 und 20 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
• Labtek®s Chamber Slides™	8-well; 0,8 cm ² ; Permanox™	Nunc, USA
• Mikrotiterplatten	<ul style="list-style-type: none"> ○ 96-well, BD-Falcon™ mit Deckel (BCA-Assay) ○ 96-well PCR-Platte 	BD Biosciences, USA Thermo Scientific, USA
• Parafilm		American National Can™, USA
• Pasteurpipetten	230 mm	Roth, Karlsruhe

• Pipettenspitzen	mit (steril, RNase-frei) und ohne Filter; 10, 200 und 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
• Plastikpipetten	○ 10 ml ○ 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
• Reaktionsgefäße	○ 0,2 ml PCR-Gefäße ○ 0,5; 1,5 und 2 ml-Gefäße ○ 15 und 50 ml Röhrchen (konisch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
• Röntgenfilme	Autoradiography film, blue, X ₇	Santa Cruz Biotechnology, USA
• Sealing-Folie	Clear Seal Diamond Heat Sealing Film	Thermo Scientific, USA
• Spritzen	○ 1 ml ○ 50 ml Perfusor-Spritze	Terumo, USA Braun, Melsungen
• Sterilfilter	Filtropur 0,2 μ m	Sarstedt, Nümbrecht
• Trägermembran (Western Blots)	Porablot PVDF, PVDF membrane Porengröße: 0,2 μ m	Macherey-Nagel, Düren
• Quarzküvetten	QS 10 mm	Eppendorf, Hamburg
• Zählkammer (Fuchs-Rosenthal)	Gesamtfläche: 16 mm ² Tiefe: 0,2 mm Volumen: 3,2 μ l	Schreck, Hofheim
• Zellkulturschalen	○ 35 x 10 mm ○ 60 x 15 mm ○ 100 x 20 mm ○ 6-Well-Platten ○ 24-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-One, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-One, Frickenhausen
• Zellschaber	1,7 cm breit	Sarstedt, Nümbrecht
• Plastikbeutel	Vernichtungsbeutel aus Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

• 10% APS-Lösung	○ 0,1 g Ammoniumpersulfat Aqua bidest. (dd H ₂ O) ad 1 ml	BioRad, München
• DNA-Ladepuffer (6x)	○ 0,4% Bromphenolblau (w/v) ○ 0,4% Xylencyanol (w/v) ○ 50% Glycerol (v/v) ○ 1 mM EDTA (pH 8)	Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

<ul style="list-style-type: none"> • EDTA-Stocklösung (0,5 M), pH 8.0 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 18,61g EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) dd H₂O ad 100ml 	Roth, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> • Laemmli-Puffer 10x 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 30g Tris ○ 144g Glycin ○ 10g Natriumdodecylsulfat (SDS) dd H₂O ad 1L 	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> • PBS 10x (Phosphate buffered saline), pH 7,4 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 80g NaCl ○ 2g KCl ○ 14,4g Na₂HPO₄ ○ 2,4g KH₂PO₄ dd H₂O ad 1L 	Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
<ul style="list-style-type: none"> • PBST 	<ul style="list-style-type: none"> ○ PBS 1x ○ 0,1% Tween® 20 	siehe PBS Merck-Suchardt, Hohenbrunn
<ul style="list-style-type: none"> • 4% PFA-Lösung 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 4g Paraformaldehyd dd H₂O ad 100 ml (über Nacht rühren) 	Roth, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> • Probenpuffer 4x (für SDS-PAGE) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 0,8g SDS ○ 4ml Glycerol ○ 2ml β-Mercaptoethanol ○ 0,01g Bromphenolblau ○ 0,3g Tris (pH 8) dd H₂O ad 10ml 	Roth, Karlsruhe Fisher Scientific, USA Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Roth, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> • RIPA-Puffer (Radioimmuno-precipitaton Assay) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 5ml Triton X-100 ○ 5g Natriumdesoxycholat ○ 0,5g SDS ○ 4,4g NaCl ○ 0,7g Na₂HPO₄ (pH 7,4) ○ 2ml EDTA-Stocklösung (0,5 M) dd H₂O ad 500ml 	Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe siehe EDTA-Stocklösung
<ul style="list-style-type: none"> • 10% SDS-Lösung 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 10g SDS dd H₂O ad 100ml (über Nacht rühren) 	Roth, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> • TBE 5x (Tris-Borat-EDTA) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 54g Tris ○ 27,5g Borsäure ○ 20ml EDTA-Stocklösung dd H₂O ad 1L 	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe siehe EDTA-Stocklösung
<ul style="list-style-type: none"> • TBS 10x (Tris buffered saline), pH 7,4 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 80g NaCl ○ 2g KCl ○ 30g Tris dd H₂O ad 1L 	Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> • TBST 	<ul style="list-style-type: none"> ○ TBS 1x 	siehe TBS

	○ 0,1% Tween® 20	Merck-Suchardt, Hohenbrunn
• TE (Tris-EDTA) pH 8	○ 0,12g Tris ○ 200 µl EDTA-Stocklösung (0,5 M) dd H ₂ O ad 100 ml	Roth, Karlsruhe siehe EDTA-Stocklösung
• Transferpuffer (für Halbtrocken-Blots)	○ 5,81g Tris ○ 2,93g Glycin ○ 0,4g SDS dd H ₂ O ad 800 ml ○ 200 ml Methanol	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
• Tris-Puffer (1,5 M) pH 8,8	○ 90,8g Tris dd H ₂ O ad 500 ml (pH mit HCl anpassen)	Roth, Karlsruhe
• Tris-Puffer (1 M) pH 6,8	○ 12,1g Tris dd H ₂ O ad 100 ml (pH mit HCl anpassen)	Roth, Karlsruhe

X-fach konzentrierte Lösungen wurden vor ihrer Anwendung mit ddH₂O auf 1x verdünnt.

2.1.4 Computer-Software und Internetseiten

• Abbildungsdesign	Adobe Illustrator CS2	Adobe Systems, München
• Bildanalyse	ImageJ 1.40g	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
• Bildbearbeitung	Adobe®Photoshop CS (8.0.1)	Adobe Systems, München
• Bilderfassung	Cell [^] F	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
• Datendarstellung / statistische Auswertung	GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software, USA
• Literatur-recherche	PubMed http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	NCBI, USA
• Literatur-verwaltung	Zotero 4.0.11	Center for History and New Media, George Mason University, USA
• Primerdesign	Universal Probe Library Assay Design Center http://www.roche-applied-science.com	Roche, Mannheim
• qRT-PCR-Daten-auswertung	StratageneMx Pro 4.10d, GenEx 5	Stratagene, Heidelberg MultiD Analyses, Schweden
• Tabellen-kalkulation	Microsoft Excel 2007	Microsoft, USA
• Textverarbeitung	Microsoft Word 2007	Microsoft, USA

2.2 Zellkultur

2.2.1 Verwendete Zelllinien

- **HC11-Zellen:** immortalisierte, murine Brustdrüsenzelllinie (Ball et al., 1988a), adhären und kontinuierlich wachsend, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nancy Hynes, Basel.
- **Δ POZ/Cre-ER-MEFs:** murine embryonale Fibroblasten aus Mäusen mit gefloxter POZ-Domäne, transfiziert mit einem CreER-Vektor, durch Tamoxifen induzierbarer POZ-Domäne-Knockdown, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Hans-Peter Elsässer, 2011.

2.2.2 Verwendete Medien und Kulturbedingungen

Beide Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, unter 5% CO₂-Begasung und wassergesättigter Atmosphäre, kultiviert.

2.2.2.1 Kultivierung von HC11-Zellen

HC11-Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

• RPMI 1640-Medium ohne L-Glutamin	Lonza, Belgien
• 10 % (v/v) FCS Gold, hitzeinaktiviert	PAA, Österreich
• 0,6 % (v/v) Gentamycin	PAA, Österreich
• 1% stabilisiertes Glutamin 200 mM (L-Glutamin)	PAA, Österreich

Unmittelbar vor Verwendung des Mediums wurde dieses Basismedium ergänzt mit:

• 1‰ (v/v) EGF	Stock: 10 µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
• 2‰ (v/v) Insulin	Stock: 10 mg/ml in ReinstH ₂ O (pH 2)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Weitere verwendete Lösungen:

• PBS	0,01 M Salzmischung in Pulverform	Sigma-Aldrich, Steinheim
• Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin/0,02% EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim

Bei einer Zelldichte von circa 95% wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen 1:5 bis 1:8 passagiert. Hierfür wurden alle verwendeten Lösungen in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zuerst

wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10ml PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für zwei Minuten in Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Untergrund ablösten. Die proteolytische Reaktion wurde durch die Zugabe von 8ml Nährmedium gestoppt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und mit dem Medium gleichmäßig vermischt. Je nach gewünschtem Splittverhältnis wurde eine entsprechende Menge dieses Zellgemischs mit frischem Nährmedium weiterverdünnt und in 55cm² - Kulturschalen (Endvolumen 10 ml) ausgesät.

2.2.2.2 Differenzierung von HC11-Zellen

Um die HC11-Zellen zur Differenzierung anzuregen, ließ man sie nach dem Passagieren für drei Tage in normalem Nährmedium (Basismedium mit 2‰ Insulin und 1‰ EGF) wachsen. Bei einer Zelldichte von 100% wurden die Zellen mit frischem Nährmedium (Basismedium mit 2‰ Insulin und 1‰ EGF) versorgt und für weitere zwei Tage inkubiert. Danach wurde zu einem Wachstumsfaktor-freien Medium (Basismedium mit 2‰ Insulin, aber ohne EGF) gewechselt. Nach 48 Stunden wurde schließlich die Differenzierung induziert, indem dem Basismedium folgende Substanzen zugefügt wurden:

• 1‰ Dexamethason	Stock: 10 ⁻³ M in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
• 1‰ Insulin	Stock: 10 mg/ml in ReinstH ₂ O (pH 2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
• 1‰ Prolaktin	Stock: 5 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim

In diesem Differenzierungsmedium wurden die Zellen für drei weitere Tage inkubiert. Um den Erfolg der Differenzierung zu überprüfen, wurden innerhalb dieser drei Tage alle 24 Stunden Zellen geerntet und mittels semiquantitativer oder qRT-PCR auf die Expression von Differenzierungsmarkern (z.B. β-Kasein) untersucht.

2.2.2.3 Kultivierung von ΔPOZ/Cre-ER-MEFs

ΔPOZ/Cre-ER-MEFs wurden in folgendem Medium kultiviert:

• Quantum 333 mit L-Glutamin		PAA, Österreich
• Puromycin	Stock: 10 µg/ml in Methanol Endkonzentration: 0,08 µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

Diese Zellen wurden in der Regel alle drei Tage bei einer Zelldichte von circa 95% unter sterilen Bedingungen 1:3 bis maximal 1:4 gesplittet. Dabei wurde genauso vorgegangen wie bei den HC11-

Zellen, wobei diese Zellen nicht in 55 cm², sondern in 21 cm²-Kulturschalen (Endvolumen 5 ml) kultiviert wurden.

Für die Herstellung von Phenol-freiem Medium wurden 500 ml des Quantum 333 mit

- | | | |
|------------------|---------------------|---------------------------------------|
| • 2,25 g | Aktivkohle | |
| • 0,225 g | Dextran T-70 | Pharmacia Fine Chemicals,
Schweden |

in einem Inkubator mit Schüttelfunktion bei 55°C für 30 Minuten gemischt. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit diesem Überstand wurde der gesamte Vorgang wiederholt. Um das Indikator-freie Medium in der Zellkultur verwenden zu können, musste dieses zum Schluss noch steril filtriert werden.

2.2.2.4 Induktion des Miz1-Knockdowns in Δ POZ/Cre-ER-MEFs

Um die POZ-Sequenz des Miz1-Gens auszuschneiden, muss die Cre-ER-Rekombinase im Zytoplasma der Zellen durch den Östrogen-Rezeptormodulator Tamoxifen aktiviert werden. Dazu wurden die Zellen 1:3 gesplittet und 21 cm²-Kulturschalen ausgesät. Nachdem die MEFs für mindestens 24 Stunden gewachsen waren, wurde das Medium der Zellen gewechselt. Das frische Medium war ergänzt durch:

- | | | |
|---|---|--------------------------|
| • 0,01 μM Tamoxifen | Hydroxytamoxifen
Stock: 10 mM in Ethanol (99,8%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
|---|---|--------------------------|

Kontrollproben wurden mit einer entsprechenden Menge 99,8%igem Ethanol versehen. Die Aktivierung der Cre-ER-Rekombinase erfolgte in der Regel für 48 Stunden, bevor mit diesen Zellen weitere Experimente durchgeführt wurden.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um bei wiederholten Versuchen gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurden die konfluenten Zellen zur Aussaat entweder immer im selben Verhältnis gesplittet oder vor der Aussaat ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Objektträger mit einem speziellen, eingravierten Gitternetz aus 16 Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Auf diesem Objektträger kann ein angefeuchtetes Deckgläschen befestigt werden, wodurch zwischen Objektträger und Deckgläschen ein kleiner Hohlraum gebildet wird, der ein Volumen von 3,2 μ l fassen kann. Nach Beendigung der Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von Medium, wurde ein entsprechendes Volumen dieser

Zellsuspension in den Hohlraum pipettiert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop konnten nun die Zellen in vier diagonal verlaufenden Großquadraten ausgezählt werden, was einem Volumen von 200nl pro Großquadrat entsprach. Anschließend wurde der Mittelwert der Zellzahl der vier Großquadrate gebildet und mit dem Faktor 5000 multipliziert, wodurch sich die Zellzahl pro Milliliter ergab.

2.2.4 Stimulation der Autophagie in Zellen

2.2.4.1 Stimulation der Zellen durch EBSS und HBSS

Verwendete Lösungen und Substanzen:

• EBSS (Earle`s Balanced Salt Solution)		Hyclone, Thermo scientific, Karlsruhe
• HBSS 10x (Hank`s Balanced Salt Solution)	Verdünnung: 1:10 in sterilem Wasser	Invitrogen, Darmstadt
• DMSO (Dimethylsulfoxid)		Roth, Karlsruhe
• E-64d	Stock: 2 mg/ml in DMSO Endkonzentration: 10 µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim bzw. PeptaNova, Sandhausen
• Pepstatin A, microbial	Stock: 2 mg/ml in DMSO Endkonzentration: 10 µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

Zur Stimulation der Autophagie durch Nährstoffentzug, wurden die Zellen für 1-24 Stunden (in den meisten Experimenten für 6 Stunden) entweder in EBSS oder HBSS inkubiert. Um den Abbau von Autophagosomen durch ihre Verschmelzung mit Lysosomen zu verhindern, wurden die Proben zum Teil mit den lysosomalen Inhibitoren Pepstatin A und E-64d versehen. Durch die Zugabe dieser lysosomalen Inhibitoren konnte der autophagische Fluss unterbrochen werden und die Autolysosomen akkumulierten (Klionsky et al., 2008a). Der Nachweis der Autolysosomen erfolgte anschließend durch Autophagie-Marker, wie z.B. LC3 (Kabeya et al., 2000).

Nachdem die Lösungen vorbereitet und auf 37°C erwärmt waren, wurde das Nährmedium von den Zellen entfernt und das jeweilige Hungermedium für die gewünschte Zeit hinzugegeben. Um sicher zu stellen, dass eventuelle Effekte auf den Einfluss des nährstoffarmen Mediums zurückzuführen sind, wurden zur Kontrolle Zellproben für die gleiche Zeit in normalem Nährmedium inkubiert. Sowohl innerhalb der Stimulationsbedingung, als auch in der Kontrollbedingung wurde jeweils eine Schale mit

je 10 µg/ml der beiden Inhibitoren versehen. In den Bedingungen ohne Inhibitoren wurde eine entsprechende Menge DMSO verwendet.

2.2.4.2 Stimulation der Zellen durch Rapamycin

In Zellen kann auch unabhängig vom Nährstoffangebot durch Rapamycin Autophagie induziert werden. Rapamycin inhibiert das Regulator-Molekül TOR, welches normalerweise Autophagie hemmt (Noda and Ohsumi, 1998). Zur Stimulation der Zellen wurde normales Nährmedium ergänzt durch:

• Rapamycin	Stock: 1 µg/µl in DMSO Endkonzentrationen: 100 nM, 150 nM und 200 nM	Sigma-Aldrich, Steinheim
--------------------	--	--------------------------

In diesem Medium wurden die Zellen für 3 Stunden, mit und ohne lysosomale Inhibitoren, inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellproben in normalem Nährmedium, dem anstelle von Rapamycin eine entsprechende Menge DMSO beigemischt wurde, mitgeführt.

2.2.5 Infektion von Zellen mit Retroviren

Verwendete Vektoren:	Bezeichnung:	Funktion:
• pB-GFP	pBABE-H2B-GFP	Expression des Histons H2B-GFP → Überprüfung der Infektionseffizienz
• pB-Ø	pBABE-puro-Ø	Leervektor → Kontrollvektor für die pBABE-puro-Expressionsvektoren
• pB-Miz1	pBABE-puro-Miz1	Überexpression von humanem Miz1
• pB-Myc	pBABE-puro-Myc	Überexpression von humanem c-Myc
• pB-MycVD	pBABE-puro-MycV394D	Überexpression der MycV394D-Mutante → Bindung von Miz1 an Myc nicht möglich
• pB-shScr	pBABE-puro-shScr	Kontrollvektor für shRNA-Expressionsvektoren → Expression einer mRNA-Sequenz für die keine komplementäre Sequenz im Genom vorhanden ist
• pB-sh1	pBABE-puro-shMiz1	Knockdown des <i>Miz1</i> -Gens

Die Vektoren wurden freundlicherweise von AG Eilers/Würzburg zur Verfügung gestellt.

Bei der retroviralen Infektion von Zellen handelt es sich um eine gentechnische Methode, durch die DNA mit Hilfe von Retroviren dauerhaft in eukaryotische Zellen eingebracht werden kann. Zur

Herstellung der Retroviren werden einerseits ein retroviraler Vektor und andererseits eine Verpackungszelllinie benötigt. Die Verpackungszellen, z.B. Phönixzellen, enthalten ein Helfergenom mit allen nötigen genetischen Informationen für die Bildung der retroviralen Strukturproteine, die für das spätere Verpacken der retroviralen Vektor-RNA notwendig sind. Bei den retroviralen Vektoren handelt es sich um Plasmide, die das gewünschte Transfergen sowie ein Verpackungssignal enthalten. Weiterhin vermitteln sie eine Puromycinresistenz, wodurch infizierte Zellen selektiert werden können. Durch die Transfektion der Phönixzellen mit den retroviralen Plasmiden werden diese zur Virusproduktion befähigt. Die hierbei entstehenden Retroviren werden in das Kulturmedium abgegeben, welches nachher zur Infektion von Zellen verwendet werden kann.

Bei der Infektion von Zellen mit den gewonnenen Virusüberständen binden die Viren an Rezeptoren der Zelloberfläche und übertragen ihr Genom auf die Wirtszelle. Dieser Vorgang wird auch Transduktion genannt. In der Wirtszelle wird nun die Virus-RNA durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und anschließend stabil in das Wirtsgenom integriert, wodurch Zellen dann das gewünschte Gen dauerhaft exprimieren. Die Viren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sowie ein Großteil der infizierten Zellen, wurden freundlicherweise von Adrián Sanz Moreno (AG Elsässer) zur Verfügung gestellt.

Zur Infektion der Zellen wurden am Vortag je 500000 Zellen in 55 cm²-Kulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml frisches Medium, das vorher mit

• 5 µl Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Stock: 4 µg/µl	Sigma, Deisenhofen
---	----------------	--------------------

versetzt wurde, ersetzt. Nun wurden je 3 ml der viralen Überstände kurz auf 37°C erwärmt und anschließend ebenfalls zu den Zellen gegeben. Nach 15-stündiger Inkubation mit dem virushaltigen Medium wurde dieses durch weitere 5 ml Nährmedium ergänzt. Am nächsten Tag, mit Erreichen der Konfluenz, konnten die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und in Selektionsmedium mit

• Puromycin	Stock: 10 mg/ml in Methanol Endkonzentration: 2 µg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
--------------------	--	--------------------------

ausgesät werden. Nach zwei weiteren Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Einer der Virusüberstände enthielt einen GFP-H2B-Vektor (ohne Puromycinresistenz), während in den anderen Virusüberständen die gewünschten Transfergene enthalten waren. Der GFP-Vektor diente der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der Infektionseffizienz. Im Gegensatz zu Zellen, die mit einem Vektor infiziert wurden, der neben dem Transfergen eine Puromycinresistenz vermittelt,

sollten die GFP-Zellen durch spätere Zugabe des Selektionsmediums alle absterben und dienten so als Referenz für die Selektionsdauer. Nach ausreichender Selektion der infizierten Zellen standen diese für weitere Experimente zur Verfügung.

2.2.6 Herstellung von HC11-Zelllinien, die GFP-markiertes LC3 stabil überexprimieren

Um die Bildung der Autophagosomen in Echtzeit darstellen und beurteilen zu können, wurden HC11-Zellen stabil mit GFP-markierten LC3-Plasmiden transfiziert.

2.2.6.1 Transfektion von Zellen durch Lipofectamine™ 2000

<u>Verwendete Vektoren:</u>	<u>Funktion:</u>	
• pEX-GFP-hLC3WT	Überexpression von GFP-markiertem LC3	Addgene, USA
• pEX-GFP-hLC3ΔG	Überexpression einer GFP-markierten LC3-Mutante, die zur Autophagosomenbildung nicht fähig ist	Addgene, USA

<u>Verwendete Lösungen:</u>		
• DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	<ul style="list-style-type: none"> ○ ohne L-Glutamin ○ 1g/L Glukose 	Lonza, Belgien
• Lipofectamine™2000		Invitrogen, Darmstadt

Zur Herstellung von Zelllinien, die die beiden oben genannten Plasmide stabil exprimieren, wurden HC11-Zellen mittels Lipofectamine™2000 transfiziert (Dalby et al., 2004). Dieses Transfektionsreagenz enthält kationische Lipide, die sich spontan zu nach innen und nach außen hin positiv geladenen Liposomen zusammenlagern. Im Inneren schließen die Lipidkomplexe die negativ geladene Plasmid-DNA ein. Durch elektrostatische Wechselwirkungen binden die positiv geladenen Liposomen an die negativ geladene Zellmembran, wodurch ihre Aufnahme durch Endozytose eingeleitet wird. Im Inneren der Zelle wird die Plasmid-DNA aus den Endosomen freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo sie ins Genom integriert wird.

Am Tag der Transfektion sollten die Zellen in 55 cm²-Kulturschalen etwa 90-95% konfluent sein. Für jeden Plasmid-Vektor wurden 24 µg Plasmid-DNA in 1,5 ml DMEM verdünnt, sowie, in einem weiteren Reaktionsgefäß, 60 µl Lipofectamine™2000 mit DMEM auf 1,5 ml aufgefüllt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die beiden Lösungen miteinander vermischt und für

weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das verbrauchte Medium der Zellen durch 15 ml frisches Nährmedium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Plasmid-Lipofectamine™2000-Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schaukeln der Kulturschalen mit dem Medium gemischt. Nach sechs Stunden erfolgte der Austausch des Transfektionsmediums gegen normales Nährmedium.

2.2.6.2 Entwicklung einer stabilen Zelllinie

Verwendete Substanzen:

• Baysilone-Paste	Hochviskös	Bayer, Mettmann
• Geneticin (G418Sulfate)	Stock: 10 mg/ml in H ₂ O Endkonzentration: 300 µg/ml	PAA, Österreich

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis von 1:10 gesplittet und mit Selektionsmedium versehen. Zur Selektion wurde das Antibiotikum Geneticin benutzt. Da zu Beginn der Selektion recht viele Zellen durch das Antibiotikum starben, wurde nach zwei Tagen das Medium der Zellen erneuert. Nun musste einige Tage gewartet werden bis sich um die einzelnen transfizierten Zellen größere Kolonien gebildet hatten. Dann wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Klone, die das GFP in einer mittleren Intensität exprimierten ausgesucht und die Stellen, an denen diese Kolonien wuchsen mit einem Stift auf der Unterseite der Kulturschale markiert. Für den Transfer der einzelnen Klone in eigene Kulturgefäße, wurde eine 24-Well-Platte mit 1 ml Nährmedium pro Well vorbereitet. Nun wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und sterile Klonierungsringe mit Baysilone-Paste auf den Boden der Schale geklebt, sodass sie die Kolonien umschlossen. Die eingeschlossenen Zellen konnten nun unabhängig von der restlichen Kulturschale mit 150 ml Trypsin/EDTA für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert werden, bis sie sich vom Untergrund ablösten. Anschließend wurden die kompletten 150 ml der Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen und in ein Well der 24-Well-Platte transferiert. Nachdem die Zellen in diesen Gefäßen dicht gewachsen waren, konnten sie in entsprechend größere Gefäße überführt werden, solange, bis sie in 55 cm²-Schalen wuchsen.

2.2.7 Immunzytochemische Färbungen

Verwendete Lösungen:

• Blocklösung	4% Albumin Fraktion V in PBST	Roth, Karlsruhe
• Glycin-Lösung	10 mg/ml in PBS	Roth, Karlsruhe

• Hoechst Dye 33258	Stock: Verdünnung:	1mg/ml in ddH ₂ O 1:1500 in PBS	Polyscience Inc., USA
• Mowiol™ 4-88- Gebrauchslösung			Hoechst, Frankfurt
• 4% PFA-Lösung			siehe Abschnitt 2.1.3
• PBS			siehe Abschnitt 2.1.3
• PBST			siehe Abschnitt 2.1.3
• Phalloidin-TRITC	Stock: Verdünnung:	0,1 mg/ml in ddH ₂ O 1:400 in PBS	Sigma, Steinheim

Primärantikörper:

• Anti-Rat LC3	Spezies: Verdünnung:	Kaninchen 1:500 in Blocklösung	MBL, Japan
-----------------------	-------------------------	--------------------------------------	------------

Sekundärantikörper:

• Anti-Kaninchen Alexa 488	Spezies: Verdünnung:	Ziege 1:1600 in Blocklösung	Molecular Probes, USA
---------------------------------------	-------------------------	-----------------------------------	-----------------------

Für immunzytochemische Färbungen wurden Zellen in Lab-TeK®s kultiviert. Für Experimente mit HC11-Zellen wurden 85000 Zellen pro Kammer, für Experimente mit Δ POZ/Cre-ER-MEFs zirka 10000 Zellen pro Kammer ausgesät. Einen Tag später konnte in den Zellen, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, Autophagie stimuliert werden.

2.2.7.1 LC3-Immunfluoreszenz-Färbung

Durch einen spezifischen Antikörper gegen LC3 kann in Zellen das Verteilungsmuster des Proteins dargestellt werden. Hierbei bindet der Primärantikörper spezifisch an das LC3 der Zelle. Der Primärantikörper wird dann anschließend durch einen Sekundärantikörper, der an ein Fluorochrom gekoppelt ist, detektiert.

Die einzelnen Schritte der Immunfluoreszenzfärbung wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich immer auf eine Kammer des Lab-TeK®, für alle Waschschritte wurden 250 μ l PBS pro Kammer verwendet. Nach Stimulations-Ende wurden die Zellen vorsichtig einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 250 μ l 4%-PFA-Lösung unter dem Abzug fixiert. Zur vollständigen Entfernung des PFA erfolgte nun ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS. Im nächsten Schritt wurden freie Aldehydgruppen durch eine 20-minütige Inkubation in 250 μ l Glycinlösung abgesättigt und anschließend erneut einmal

gewaschen. Um die Zellen für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden sie nun für zehn Minuten mit 250 µl PBST permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde in jede Kammer 150 ml Blocklösung pipettiert und für 45 Minuten auf den Zellen gelassen. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. In der Zwischenzeit wurde eine 1:500-Verdünnung des Primärantikörpers in Blocklösung hergestellt. Schließlich wurden die Zellen in 150 µl der Primärantikörperlösung über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden zuerst ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Daraufhin fand die Inkubation mit dem Sekundärantikörper statt. Hierfür wurde eine 1:1600-Verdünnung des Antikörpers in Blocklösung hergestellt und jeweils 150 µl davon für eine Stunde zu den Zellen gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Chromatin-Färbung, wobei die Hoechst-Stocklösung 1:1500 in PBS verdünnt und 150 µl dieser Lösung für fünf Minuten in die Kammern gefüllt wurde. Sowohl die Inkubation in dem Sekundärantikörper, als auch die Anfärbung des Zellkerns erfolgte im Dunkeln. Nun erfolgte ein letztes dreimaliges Waschen in PBS, bevor die Aufsätze der Lab-Tek®s von den Objektträgern entfernt werden konnten. Nach kurzem Eintauchen in Reinstwasser, konnte ein Deckgläschen mit 55 µl Mowiol™ auf den Objektträgern befestigt werden.

Um sicher gehen zu können, dass der verwendete Erstantikörper für das Proteinmuster verantwortlich ist und dieses nicht durch unspezifische Bindung des Zweitantikörpers zustande kommt, wurde in jedem Experiment ein Kontroll- Lab-Tek® ohne Primärantikörperbehandlung mitgeführt.

Nun konnten die angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Während Zellen, die autophagisch inaktiv waren, ein weitgehend homogen gefärbtes Zytoplasma zeigten, waren in stimulierten Zellen leuchtende Punkte (=LC3-Punkte) zu sehen. Diese Punkte kamen dadurch zustande, dass LC3 in der Autophagosomenmembran stark konzentriert ist (Kabeya et al., 2000). Ein solcher LC3-Punkt entspricht einem Autophagosom und die Anzahl der LC3-Punkte kann zur Quantifizierung der autophagischen Aktivität einer Zelle verwendet werden (Klionsky et al., 2008a). Für die quantitative Auswertung der LC3-Färbung wurden mindestens zehn verschiedene Ausschnitte innerhalb einer Kondition in 40-facher Vergrößerung fotografiert und die Anzahl der Punkte pro Zelle mit Hilfe des Programms ImageJ in insgesamt 100 Zellen ausgezählt.

2.2.7.2 Fixierung von Zellen, die GFP-markiertes LC3 überexprimierten

Für Zellen, die GFP-markiertes LC3 überexprimierten (siehe Abschnitt 2.2.6), war natürlich keine Antikörperfärbung gegen LC3 mehr nötig. Diese Zellen wurden nach Ende der Stimulation ebenfalls einmal mit PBS gewaschen und für eine halbe Stunde in 4%PFA-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für zehn Minuten mit PBST permeabilisiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff, bevor die Kerne der Zellen angefärbt wurden. Hierzu wurde analog zu Abschnitt 2.2.7.1 eine Verdünnung der Hoechst-Lösung hergestellt und die Zellen für fünf Minuten im Dunkeln darin inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde jeweils der Aufsatz des Lab-Tek®s vom Objektträger entfernt, der Objektträger einmal kurz in Reinstwasser getaucht und auf diesem ein Deckgläschen mit Mowiol™ befestigt. Von allen Lösungen wurden die gleichen Mengen und Konzentrationen wie in Abschnitt 2.2.7.1 eingesetzt.

2.2.7.3 Phalloidin-Färbung

Zur Beurteilung des Aktin-Zytoskeletts einer Zelle kann eine Färbung mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin vorgenommen werden. Das Phalloidin bindet hochaffin an F-Aktin einer Zelle (Wieland, 1987). Wie in den beiden vorhergehenden Abschnitten beschrieben, wurden die Zellen nach Beendigung der Stimulation dreimal mit PBS gewaschen und für eine halbe Stunde in 4%PFA-Lösung fixiert. Nach weiteren drei Waschschriffen wurden die Zellen für zehn Minuten in PBST inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Nun erfolgte die Herstellung einer 1:400-Verdünnung des Phalloidin-Stocks in PBS, welche anschließend für eine halbe Stunde unter dem Abzug auf die Zellen gegeben wurde. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen. Für die Chromatin-Färbung und das Eindecken des Objektträgers wurde wie in Abschnitt 2.2.7.1 vorgegangen.

2.2.8 Elektronenmikroskopie

Verwendete Puffer und Lösungen:

• Cacodylatpuffer (0,1 M) pH7,3	○ 21,45 g Na-Cacodylsäure ddH ₂ O ad 1 L	Serva, Heidelberg
• Cacodylatpuffer (0,2 M) pH7,3	○ 42,9 g Na-Cacodylsäure ddH ₂ O ad 1 L	Serva, Heidelberg
• Epongebrauchslösung	○ Epon-Lösung A: - 62 ml Glycidether 100 - 100 ml Dodecylbernstein- säureanhydrid	Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Epon-Lösung B: <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml Glycidether100 - 89 ml Methylnadicanhydrid ○ Beschleuniger: 2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethylphenol) <p>2 Teile Epon-Lösung A wurden mit 3 Teilen Epon-Lösung B und 0,02 ml/ml Beschleuniger gemischt</p>	Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg
• Ethanol	99,8%ig, p.a. (Verdünnungsreihe: 50%, 70%, 90% v/v in ddH ₂ O)	Roth, Karlsruhe
• Fixierlösung (Ito und Karnovsky)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 25 ml Paraformaldehyd (8% w/v in H₂O) ○ 8 ml Glutaraldehyd (25% w/v in H₂O) ○ 8 ml Cacodylatpuffer (0,1 M) ○ 36 ml Cacodylatpuffer (0,2 M) ○ 3 ml Pikrinsäure 	Fluka, Neu-Ulm Serva, Heidelberg siehe oben siehe oben Merck, Darmstadt
• Gelantinekapseln		Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
• Kaliumferrocyanat-Lösung	○ Kaliumferrocyanat (2% w/v in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
• OsO₄-Lösung	○ Osmiumtetroxid (3% w/v in H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
• Propylenoxid		Serva, Heidelberg

Zur ultrastrukturellen Analyse der Zellen wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Hierfür wurden die Zellen in 21 cm²-Schalen kultiviert und wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben durch EBSS stimuliert. Nach Versuchsende wurden die Zellen einmal in PSB gewaschen und für 30 Minuten in je 5 ml Fixierlösung nach Ito und Karnovsky inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung mit 5 ml Cacodylatpuffer (0,1 M) abgewaschen. Nach dem Waschschrift wurden weitere 5 ml Cacodylatpuffer (0,1 M) zu den fixierten Zellen gegeben. So konnten diese, wenn nötig, für einige Tage in Kühlschrank aufbewahrt werden.

Am nächsten Morgen wurde der Puffer entfernt und nochmals 1 ml Cacodylatpuffer (0,1 M) in die Kulturschalen pipettiert. Nun konnten die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig vom Untergrund abgelöst und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt werden. Darauf folgend wurde für fünf Minuten bei 8000 g zentrifugiert und hinterher der Überstand vorsichtig entfernt. Die Zell-Pellets wurden nun durch Zugabe von jeweils 100 µl Kaliumferrocyanat-Lösung sowie 100 µl OsO₄-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur nachfixiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer 5-minütiger

Zentrifugationsschritt bei 8000g, nach dem die Kaliumferrocyanat/OsO₄-Mischung entfernt und das Pellet gewaschen wurde. Zum Waschen wurde für 15 Minuten 500µl Cacodylatpuffer (0,1M) auf die Pellets gegeben. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Cacodylat-Puffer durch Frischen ersetzt. An dieser Stelle konnte das Protokoll unterbrochen und die Ansätze über Nacht im Kühlschrank gelagert werden.

Am nächsten Tag wurde zuerst die Epongebrauchslösung angesetzt und für mindestens 20 Minuten mit einem Glasstab verrührt, solange bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nun erfolgte die Entwässerung der Zellen durch eine Alkoholverdünnungsreihe. Dabei wurden die Zell-Pellets jeweils für 15 Minuten und in einem Volumen von 500µl in 50%igem, in 70%igem und je zweimal in 90%igem und 100%igem Alkohol inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgte jeweils ein drei-minütiges Zentrifugieren bei 10000 g. Nach der Entwässerung wurden die Pellets zweimal für je 15 Minuten in 300µl Propylenoxid inkubiert. Diese Substanz vermittelte die Löslichkeit zwischen den alkoholhaltigen Zellpelletes und der Epongebrauchslösung. Als nächstes wurde Propylenoxid mit der Epongebrauchslösung zu gleichen Anteilen gemischt und je 500µl davon für eine Stunde auf die Pellets gegeben. Danach wurde die Mischung entfernt und durch 300µl reine Epongebrauchslösung ersetzt. Die Ansätze blieben mit offenen Deckeln über Nacht im Abzug stehen.

Am nächsten Morgen erfolgte dann die Einbettung der Zell-Proben in Kunstharz-Blöckchen. Hierfür wurden nummerierte geöffnete Gelatine-Kapseln vorbereitet und in diese je ein Tropfen Epon-Gebrauchslösung vorgelegt. Von den Eppendorf-Gefäßen wurde mit Hilfe einer Rasierklinge die Spitze, die das in Epon-Gebrauchslösung eingelegte Zell-Pellet enthielt, abgetrennt, sodass die Pellets leichter zugänglich waren. Mit einer Präpariernadel wurde ein Teil der Zellpellets aufgenommen und in die vorbereitete Gelatine kapsel überführt. Ein Pellet wurde dabei auf drei Kapseln aufgeteilt. Nach dem Transfer der Pellets wurden die Gelatine kapseln mit Epongebrauchslösung aufgefüllt. Innerhalb von etwa einer Stunde hatten sich die Zellpellets am Boden der Kapseln abgesetzt und konnten dann für 2-3 Tage bei 60°C im Ofen aushärten. Die Anfertigung der Ultradünnschnitte, sowie der elektronenmikroskopischen Bilder wurden freundlicherweise von Ursula Lehr und Prof. Hans-Peter Elsässer übernommen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen

Verwendete Lösungen und Materialien:

• Tri®Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
• Chloroform	Merck, Darmstadt
• NucleoSpin®RNA Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
• rDNase Set	Macherey-Nagel, Düren
• Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Zur Gewinnung von RNA wurden Zellen in Tri®Reagent geerntet und deren RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) isoliert. In allen Schritten des folgenden Protokolls wurde auf Arbeiten in RNase-freier Umgebung und die Verwendung RNase-freier Utensilien geachtet. Die Reinigung der Arbeitsflächen erfolgte mit einer Lösung aus 0,1M NaOH und 0,25% (w/v) Natriumhypochlorid. Zu Beginn wurde das Medium der Zellen abgesaugt und diese einmal in kaltem PBS gewaschen. Dann wurde 1ml Tri®Reagent in die Kulturschale pipettiert und verteilt. Nun konnten die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst werden und nach sorgfältigem Mischen durch Auf- und Abpipettieren in ein 2ml Eppendorfggefäß überführt werden. Es erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. An dieser Stelle konnte das Protokoll durch Einfrieren der Zellsuspensionen bei -80°C unterbrochen werden. Im weiteren Verlauf wurden 200µl Chloroform zu den Proben gegeben. Die Ansätze wurden nun für 30Sekunden kräftig geschüttelt und dann für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 g bildeten sich zwei Phasen in der Zellsuspension. Die untere organische Phase enthielt nun die Proteine, während in der oberen, wässrigen Schicht die RNA gelöst war. Die RNA-haltige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde erneut für 15Minuten bei 4°C und 12000 g zentrifugiert, wobei ein RNA-haltiges Pellet entstand. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 90µl RNase freiem Wasser gelöst. Um die Reinheit der RNA zu optimieren, wurden die Proben mit rDNase behandelt, welche für den Abbau eventuell vorhandener DNA-Reste sorgte. Dazu wurde eine 1:10-Verdünnung aus DNase in DNase-Puffer hergestellt. Hiervon wurden 9 µl zu jedem Ansatz gegeben und dann für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte die Aufreinigung der RNA mit Hilfe eines RNA-Clean-up Kits. Dazu wurden zunächst pro Ansatz eine Mischung aus 300µl RA1-Puffer mit 300µl

98%-igem Ethanol hergestellt und zu den Proben gegeben. Das Gemisch wurde nun auf die RNA-Bindesäulen geladen und für zehn Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silica-Membran der Säule. Das Sammelgefäß mit dem durchgelaufenen Puffer wurde verworfen und durch ein Frisches ersetzt. Als nächstes wurde durch die Zugabe von 700 µl RA3-Puffer und eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 10000 g ein erstes Mal gewaschen. Im zweiten Waschschrift wurden 350 µl RA-Puffer auf die Säulen pipettiert und für zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Nun wurden die Säulen mit offenem Deckel auf ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt und für drei Minuten stehen gelassen. Im letzten Schritt wurde die RNA aus der Silica-Membran der Säule mit 40-50 µl RNase-freiem Wasser durch einminütiges Zentrifugieren bei 10000 g eluiert. Die gereinigte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Mit Hilfe eines Photometers kann unter anderem die Konzentration von gelöster RNA oder DNA bestimmt werden. Zur Konzentrationsmessung wird ein Lichtstrahl durch die zu untersuchende Lösung gesendet. Es handelt sich um UV-Strahlung mit der Wellenlänge 260 nm, die durch eine Deuteriumlampe erzeugt wird. Dieses Licht wird von Nukleinsäuren am stärksten absorbiert. Bei Durchtritt durch die Lösung wird ein Teil der Strahlung von der Probe absorbiert, die Intensität der übrigen Strahlung wird nach deren Austritt aus der Quarzküvette von dem Photometer gemessen. Durch den gemessenen Absorptionwert kann mit folgender Formel die Stoffmengenkonzentration der Lösung ermittelt werden:

$$\text{Stoffmengenkonzentration (c)} = \text{Absorption} \times \text{Verdünnung der Lösung} \times \text{Konstante}$$

Der Wert der Konstante ist abhängig von der Art der Nukleinsäuren:

- doppelsträngige DNA: 50 µg/ml
- einzelsträngige DNA und RNA: 40 µg/ml
- einzelsträngige Oligonukleotide: 20 µg/ml

Proteine absorbieren vor allem Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm. Durch die Bildung eines Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} kann die Qualität der Proben bestimmt werden. Dabei sollten reine RNA-Proben einen Quotienten von >1,8 haben.

Für die Messung wurden die Proben 1:100 in TE verdünnt und 300 µl dieser Lösung in einer Quarzküvette gegen 300 µl reines TE als Leerwert gemessen.

2.3.3 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, St. Leon Rot) konnte RNA in cDNA umgeschrieben werden. In einem 0,2µl-Reaktionsgefäß wurde zu 1µg RNA 1µl Random-Hexamer-Primer (0,2µg/µl) pipettiert und anschließend mit DEPC-behandeltem Wasser auf 12µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für fünf Minuten bei 70°C inkubiert und danach für drei Minuten auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde eine Mischung aus folgenden Substanzen hergestellt:

- **1 µl RevertAid™ H Minus M-MuIV Reverse Transkriptase (200 U/µl)**
- **1 µl RiboLock™ Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µl)**
- **2 µl dNTP-Mix (10 nM)**
- **4 µl Reaktionspuffer (5x)**

Nach Zugabe dieser Mischung erfolgte zur Anlagerung der Primer eine fünfminütige Inkubation bei 25°C. Im nächsten Schritt wurde für eine Stunde bei 42°C der zur RNA komplementäre DNA-Strang durch das Schlüsselenzym Reverse Transkriptase synthetisiert. Danach wurde das Enzym durch eine Inkubation bei 70°C für zehn Minuten hitzeinaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

2.3.4 Semiquantitative PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Methode, mit der *in vitro* DNA vervielfältigt werden kann (Mullis et al., 1986).

Der Ablauf der PCR wird in drei Schritte eingeteilt:

1. *Denaturierung*: Durch eine Erhitzung auf circa 94°C werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt.
2. *Primer Annealing*: Bei einer Temperatur von 50-60°C lagern sich die Primer an die jeweils komplementären DNA-Sequenzen an. Die Primer werden dabei so gewählt, dass sie die gewünschte Sequenz, die amplifiziert werden soll, flankieren.
3. *Elongation*: Die DNA-Polymerase synthetisiert bei einer Temperatur von 72°C einen komplementären Strang zu der gewünschten Sequenz.

Diese drei Schritte werden in einem Thermocycler in folgendem Programm insgesamt 35 Mal wiederholt:

- 3 Min. bei 94°C
 - 30 Sek. bei 94°C
 - 30 Sek. bei 58°C
 - 2 Min. bei 72°C
 - 10 Min. bei 72°C
- } 35 Zyklen

Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

• 3 µl	cDNA		
• 1 µl	dNTPs 10nM		Fermentas, St.Leon-Rot
• 5 µl	10x PCR Master-Mix		Sigma, Deisenhofen
• 10 µl	Primer-Mix	Stock: 10 picomol/µl in TE Verdünnung: 1:10 in ddH ₂ O	Metabion, Martinsried
• 2 µl	REDTaq Polymerase		Sigma, Deisenhofen
• 5 µl	MgCl₂		Fermentas, St.Leon-Rot

Dieser Ansatz wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt und nach der PCR Reaktion mit 10 µl 6x-DNA-Probenpuffer vermischt. 10 µl der Probe wurden auf ein Agarose-Gel geladen und durch Elektrophorese aufgetrennt.

Verwendete Primer:

Genprodukt:	Sequenz:	Produktgröße:
<i>β-Aktin</i>	for: 5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' rev: 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'	104 bp
<i>β-Kasein</i>	for: 5'-ACTGTATCCTCTGAGACTG-3' rev: 5'-TCTAGGTACTGCAGAAGGTC-3'	578 bp
<i>Myc</i>	for: 5'-CTTTCCTACCCTCTCAACGA-3' rev: 5'-TCAACTGTTCTCGTCGTTCC-3'	698 bp

2.3.5 Real Time PCR (qRT-PCR)

Im Unterschied zur herkömmlichen PCR kann mit Hilfe der qRT-PCR die Quantifizierung eines Genprodukts in Echtzeit vorgenommen werden. Um ein Gen nachzuweisen, werden wie bei der semiquantitativen PCR, unmarkierte, für ein bestimmtes Gen spezifische Oligonukleotid-Primer verwendet, die sich an die jeweils komplementäre Sequenz der DNA-Probe anlagern.

Zur Detektion der nach jedem PCR-Zyklus vorhandenen DNA-Menge wird der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR-Green verwendet. Dieser interkaliert in doppelsträngiger DNA und ist nur unter dieser Bedingung fluoreszierend. Somit verhält sich die Stärke der Fluoreszenz proportional zur Anzahl der PCR-Produkte.

Am Anfang der Reaktion liegt nur die in der Probe eingesetzte, relativ geringe DNA-Menge vor, die für die Hintergrund-Fluoreszenz verantwortlich ist. In der anschließenden exponentiellen Phase sollte sich unter optimalen Bedingungen das Genprodukt nach jedem Zyklus verdoppelt haben. Am Ende der PCR, in der sogenannten Plateau-Phase, hat sich die DNA-Menge so stark vermehrt, dass die PCR-Produkte miteinander hybridisieren und dadurch die Reaktion hemmen (Holzapfel and Wickert, 2007).

Für die Quantifizierung der Genexpression wird die Fluoreszenz zu Beginn der exponentiellen Phase gemessen und ein Analysezeitpunkt bestimmt, bei dem es sich um den Zyklus (=CT =Threshold Cycle) handelt, indem die Fluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt. Um eventuelle Fehler, wie z.B. unterschiedlich eingesetzte Konzentrationen der DNA-Proben auszuschließen, wird in derselben Probe neben der Expression des zu untersuchenden Gens auch die Expression eines Referenzgens (Housekeeping-Gen; HKG) gemessen und mit diesem normalisiert. Entscheidend bei der Wahl des Housekeeping-Gens ist, dass seine Expression unter verschiedenen Versuchsbedingungen konstant bleibt und es nicht reguliert wird. In dieser Arbeit wurde für die Versuche mit MEFs *HPRT* und für Versuche mit HC11 *GAPDH* als HKG gewählt. Die Ermittlung des geeigneten HKG erfolgte mit Hilfe der unter 3.2.3.1 beschriebenen Programme GenEx und Normfinder. Bei der Berechnung der n-fachen Expression (= relativer Expressionsunterschied) wurden zuerst der ermittelte CT-Wert des Referenzgens von dem des zu untersuchenden Zielgens abgezogen, wodurch man ΔCt erhält. Der ΔCt -Wert für das zu untersuchende Gen wird zum einen in einer Probe unter Versuchsbedingungen und zum anderen in einer Kontrollprobe bestimmt und voneinander subtrahiert. Um nun die relativen Expressionsunterschiede unter verschiedenen Konditionen berechnen zu können, wurde die sogenannte $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode angewandt (Livak and Schmittgen, 2001a), welche voraussetzt, dass sich die DNA-Sequenz in jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Zusammenfassend wurden also folgende Werte gemessen bzw. berechnet:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{(Versuchsbedingung)}} - \Delta\text{CT}_{\text{(Kontrollbedingung)}}$$

$$\text{Relativer Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit dem *AbsoluteTM QPCR SYBR[®] Green Mix* (Thermo Scientific), der die meisten der nötigen Komponenten bereits enthält. Die Reaktionsansätze wurden in 96-well-Platten pipettiert und setzten sich folgendermaßen zusammen:

• 2,5 µl cDNA	Verdünnung: 1:10 in ReinstH ₂ O	
• 10 µl Primermix	Stock: 100 picomol/µl in TE	Metabion, Martinsried
	Konzentration: 200 nM in ReinstH ₂ O	
• 12,5 µl Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix		Thermo Scientific, Karlsruhe

Die CT-Werte jedes Gens wurden in drei technischen Replikaten gemessen. Nach Beendigung des Pipettierens wurde die Platte mit einer Sealing-Folie verschweißt und kurz bei 400g zentrifugiert.

Die Messung der Genexpression durch das Gerät Stratagene Mx3005P™ geschah nach folgendem Programm:

- 15 Min. bei 95°C
 - 30Sek. bei 95°C
 - 30Sek. bei 60°C
 - 30Sek. Bei 72°C
 - 1 Min. bei 95°C
 - 60°-95°C
- } 45 Zyklen

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms MxPro und Excel ausgewertet. Aus den Daten der technischen Replikate wurde ein Mittelwert bestimmt und anschließend anhand der $\Delta\Delta CT$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) die Genexpression ermittelt. Die graphische Darstellung der Genexpressionen erfolgte durch die Software GraphPad Prism, mit der ebenfalls die statistischen Analysen durchgeführt wurden.

Verwendete Primer:

Genprodukt:	Sequenzen:	Produktgröße:
Ambra1	for: 5'-GAGCACCCAATTTACCCAGA-3' rev: 5'-GATCATCTCTGGGCGTAGTA-3'	66 bp
Atg3	for: 5'-GGGTGTAATCACCCAGAAG-3' rev: 5'-TGTTGGACAGTGGTGGACTAA-3'	64 bp
Atg4a	for: 5'-CACACTGGCCTCCCTTTG -3' rev: 5'-AGTCCTCCAGTTGTTTCAGTCG -3'	90 bp
Atg4c	for: 5'-CTATTTATGTTGCCCAGGACTGTA-3' rev: 5'-AAATAATGACAGCCTTGTCCACG-3'	105 bp
Atg5	for: 5'-AAGTCTGTCCTTCCGCAGTC-3' rev: 5'-TGAAGAAAGTTATCTGGGTAGCTCA-3'	136 bp
Atg7	for: 5'-GATGACCGCATGAATGAGC-3' rev: 5'-CGAACCGTGACAGAAAACC-3'	76 bp
Atg9b	for: 5'-GGGACATCCAGGTGTTTTACA-3' rev: 5'-TTCCAGGAGGCGAGACTG-3'	95 bp
Atg10	for: 5'-GCTGTGCTAAAGAATTCACAGAAA-3' rev: 5'-AGGTAAATTCAGACCAACCACTG-3'	96 bp

Atg12	for: 5'-GGAACCTCCCGGAGACAC-3' rev: 5'-CCACAGCCCATTCTTTGTT-3'	92 bp
β-Aktin	for: 5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' rev: 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'	104 bp
Cdkn1α	for: 5'-TCCACAGCGATATCCAGACA-3' rev: 5'-GGCACACTTTGCTCCTGTC-3'	90 bp
Exoc2	for: 5'-GGGAGAACCTGGGTACTGGT-3' rev: 5'-CCGTGAGGAGGCAATTATGT-3'	72 bp
Gapdh	for: 5'-CATGGCCTTCGTGTTCTTA-3' rev: 5'-GCGGCACGTCAATCCA-3'	55 bp
Hmbs	for: 5'-TCCCTGAAGGATGTGCCTAC-3' rev: 5'-AAGGGTTTTCCGTTTGC-3'	73 bp
Hprt	for: 5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3' rev: 5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'	90 bp
Miz1	for: 5'-AGGCACACTGTCTGAGAAGAGA-3' rev: 5'-TGGTTCAGCTGCTCCAAGA-3'	96 bp
Myc	for: 5'-CCTAGTGCTGCATGAGGAGA-3' rev: 5'-TCCACAGACACCACATCAATTT-3'	93 bp
Pikfyve	for: 5'-GGCCGACTGATCTGGATTC-3' rev: 5'-CCAGCAAATGACCATCAAATAC-3'	60 bp
Sdha	for: 5'-TGTTTCAGTTCCACCCACA-3' rev: 5'-TCTCCACGACACCCTTCTG-3'	66 bp
Spast	for: 5'-CAGCCCTGGGTCCTATCC-3' rev: 5'-TTCTCATCTCACTGGCAGACAT-3'	69 bp
Ubiquilin 1	for: 5'-GAATAATCCCCTATTTGCTGGA-3' rev: 5'-TGTCGGGGTTCTGCATT-3'	92 bp
Vamp4	for: 5'-TGCAAGAGAATATTACAAAGGTAATTG-3' rev: 5'-GAAAGCGGTGGCATTATCC-3'	95 bp

2.3.6 Plasmidaufreinigung und Vervielfältigung

Zur Transfektion der HC11-Zellen mit GFP-markiertem LC3 wurden von der Firma Addgene verschiedene Konstrukte bestellt (siehe Tabelle 3.1). Die gewünschten Vektoren wurden in transformierten Bakterien als Stichkulturen geliefert.

2.3.6.1 Herstellung von Luria-Bertani Medium (LB-Medium)

Für die Kultivierung der Bakterien wurde folgendes Medium hergestellt:

• 10g	Tryptone enzymatic digest from Casein	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
• 5g	Yeast extract	Sigma, Steinheim
• 10g	NaCl	Roth, Karlsruhe

Die Substanzen wurden unter dem Abzug abgewogen, mit ddH₂O auf einen Liter aufgefüllt und verrührt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung gemessen und mit NaOH (1M) auf pH7 titriert.

2.3.6.2 Herstellung und Beimpfung von Agar-Platten

Das für die Herstellung der Agar-Platten verwendete Medium enthielt folgende Komponenten:

• 5g Tryptone enzymatic digest from Casein			Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
• 2,5g Yeast extract			Sigma, Steinheim
• 5g NaCl			Roth, Karlsruhe
• 7,5g Bacto™ Agar			Becton, Dickinson and Company, USA/Frankreich
• Ampicillin	Stock:	50 mg/ml	Boehringer, Mannheim
	Verdünnung:	1:1000 in Agar-Medium	
• Kanamycin	Stock:	25 mg/ml	Serva, Heidelberg
	Verdünnung:	1:1000 in Agar-Medium	

Auch dieses Medium wurde vor Zugabe des Bacto™ Agars auf pH7 titriert. Sowohl das LB-Medium, als auch das Agar-haltige Medium wurden für 20 Minuten autoklaviert.

Zum Gießen der Agar-Platten wurde gewartet, bis das Medium nach dem Autoklavieren auf unter 50°C abgekühlt war, bevor das für die Selektion der Bakterien nötige Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin, siehe Tabelle 3.1) zugegeben wurde. Nun konnte das fertige Medium unter einer Sterilbank in 55 cm²-Petrischalen gegossen werden. Nach etwa einer halben Stunde war das Medium geliert und die Platten konnten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

Aus den gelieferten Stikkulturen konnte nun mit Hilfe einer Impföse ein Teil der Bakterien aufgenommen und auf dem Nährboden ausgestrichen werden. Durch das Antibiotikum in den Agar-Platten wuchsen nur Bakterien, die den Vektor, der eine entsprechende Antibiotikaresistenz vermittelte, aufgenommen hatten. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.6.3 Amplifizierung der Plasmid-DNA

Am nächsten Morgen wurde in einem 12 ml Kulturröhrchen 2 ml LB-Medium mit 2 µl des jeweiligen Antibiotikums vorbereitet. Auf den beimpften Nährböden waren inzwischen Bakterienkulturen gewachsen. Einer der Klone wurde ausgesucht und mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt. Die

Pipettenspitze wurde nun in dem vorbereiteten Kulturröhrchen bei 37°C in einem Schüttler bis zum Abend inkubiert. Am Abend wurden 500µl der Kultur-Lösung aus dem Kulturröhrchen entnommen und in einen Erlenmeyerkolben mit 200ml LB Medium, das mit 200µl Antibiotikum versehen war, überführt. Die Ansätze wurden erneut über Nacht in einem Schüttler bei 37°C inkubiert.

2.3.6.4 Maxi-Präparation

Mit Hilfe einer Maxi-Präparation können größere Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert werden. Hierbei kam das NucleoBond® Xtra Maxi Kit (Macherey und Nagel, Düren) zur Anwendung.

Als erstes wurden die Übernachtskulturen in Zentrifugen-feste Plastikgefäße überführt und bei 5°C und 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde jeweils der Überstand verworfen und das Pellet in 12ml Resuspensions-Puffer mit RNase resuspendiert, bis eine homogene bräunlich-trübe Lösung entstand. Diese Lösung wurde in einen 50ml Falcon gefüllt, bevor die Zellyse eingeleitet wurde. Dazu wurden 12ml Lysis-Puffer zugegeben und unter leichtem Schwenken für fünf Minuten inkubiert, bis das Gemisch viskös wurde. Im nächsten Schritt wurde die Filtersäule, durch vorsichtiges Auftragen von 25ml Äquilibrierungspuffer am Rand der Säule, angefeuchtet. Durch Mischen des Bakterienlysats mit 12ml Neutralisationspuffer entstand eine klare Lösung mit weißen Flocken. Dieses Gemisch wurde nun auf den Filter der Säule geladen. Nachdem die Lösung durch den Filter gelaufen war, wurde der Filter mit 15ml Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend aus der Säule entfernt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift der Säule mit 25ml Wasch-Puffer. Bevor mit dem Auswaschen der Plasmid-DNA aus der Säule durch 15ml Elutionspuffer begonnen werden konnte, musste das Auffanggefäß durch einen 50ml-Falcon ersetzt werden. Zur Präzipitation der DNA wurde nach der Elution 10,5ml Isopropanol zu der Lösung in dem Falcon gegeben, gevortext und für zwei Minuten stehen gelassen. Nun wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet, das DNA Pellet mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5-10 Minuten bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Danach wurde der Alkohol aus dem Falcon entfernt und das Pellet getrocknet. Zum Schluss wurde das gereinigte DNA-Pellet durch Auf- und Abpipettieren in 400µl TE gelöst.

2.3.7 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung von Konstrukten können Restriktionsenzyme verwendet werden. Diese Enzyme erkennen und schneiden jeweils eine bestimmte DNA-Sequenz, sodass mehrere kürzere DNA-Fragmente entstehen. Wenn nun die Länge eines Plasmids oder einer amplifizierten cDNA-Sequenz

bekannt ist, kann in einem analytischen Restriktionsverdau, beim Einsatz ausgewählter Restriktionsenzyme, die Länge der entstehenden Schnittprodukte mit Hilfe von Restriktionskarten vorhergesagt werden. Für einen analytischen Ansatz wurden folgende Komponenten benötigt:

• 1 µg DNA			
• 2 µl BSA	Konzentration:	1 mg/ml	NEB, Schwalbach
• 2 µl DTT	Konzentration:	10 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
• 2 µl Puffer 10x			NEB, Schwalbach
• 1 µl pro Restriktions-Enzym			NEB, Schwalbach
• ReinstH ₂ O (auf 20 µl)			Serumwerk Bernburg AG, Bernburg

Da die Spezifität der Restriktionsenzyme von den Umgebungsbedingungen abhängt, musste für jedes Restriktionsenzym ein passender Puffer ausgewählt werden. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die verdaute DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Substanzen:

• Agarose			Roth, Karlsruhe
• DNA-Probenpuffer	Verdünnung:	1:6 mit der DNA-Probe	siehe 2.1.3
• Ethidiumbromid	Konzentration:	10 mg/ml	Sigma, Deisenhofen
• TriDye™2-Log DNA-Ladder			NEB, Schwalbach

DNA ist wegen ihrer Phosphatgruppen in wässriger Lösung negativ geladen und kann somit in einem Agarose-Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt werden. Das Agarose-Gel wirkt dabei wie ein Sieb, das je nach Konzentration, Teilchen einer bestimmten Größe zurückhalten kann. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid kann die DNA im Gel sichtbar gemacht werden. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der mit der DNA interkaliert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Durch die Verwendung eines geeigneten DNA-Markers kann die Größe der aufgetrennten DNA-Stücke relativ genau bestimmt werden. Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden 1-2%ige Agarose-Gele verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,2g (1%) oder 2,4g (2%) Agarose abgewogen und in 120 ml TBE-Puffer gelöst. Dazu war es nötig, das Gemisch in der Mikrowelle zu erhitzen. Die verdampfte

Flüssigkeit wurde anschließend durch die Zugabe von ddH₂O wieder ersetzt. Bevor das Gel in den Gel-Schlitten gefüllt wurde, wurden 2 µl Ethidiumbromid zugegeben. Nach circa 30 Minuten war das Gel geliert und einsatzbereit.

Der Gel-Schlitten wurde nun in die Elektrophorese-Kammer gesetzt und diese mit TBE-Puffer aufgefüllt. Bevor die DNA-Proben in die Gel-Taschen pipettiert werden konnten, mussten sie noch mit einem DNA-Probenpuffer beschwert werden. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden 7 µl der TriDye™2-Log DNA-Leiter auf jedes Gel aufgetragen. Die Proben wurden für 45-60 Minuten bei 100V aufgetrennt und zur Auswertung anschließend unter UV-Beleuchtung fotografiert.

2.3.9 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von DNA aus Zellen wurde das REExtract™ Kit (Sigma) verwendet. Dazu wurde das Medium der Zellen abgesaugt und diese in ihrer Kulturschale (24-well-Platte) bei -20°C eingefroren. Zu den tiefgefrorenen Zellen wurde nun pro Well eine Mischung aus 25 µl Extraction-Solution und 6,25 µl Tissue-Prep-Solution gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur sofort wieder aufgetaut. Die Suspension mit den aufgeschlossenen Zellen wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für fünf Minuten in einem Heizblock bei 95°C inkubiert. Als letztes wurde zu jedem Ansatz 25 µl Neutralisation-Solution gegeben und gevortext. Mit der gewonnenen DNA konnte nun eine Genotypisierung durchgeführt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.3.10 Genotypisierung

Um herauszufinden, ob die verschiedenen ΔPOZ/Cre-ER-MEF-Klone tatsächlich die Cre-ER-Rekombinase exprimierten und dieses Enzym in Gegenwart von Tamoxifen aktiviert wird, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Hierbei wird mittels spezifischer Primer die DNA-Sequenz, die für das gewünschte Gen kodiert, durch PCR amplifiziert und anschließend auf einem Agarose-Gel nachgewiesen.

Verwendete Lösungen:

• 2 µl DNA		
• 4 µl Primermix	Stock: 100 picomol/µl in TE Verdünnung: 1:1000 in TE	Metabion, Martinsried
• 6 µl RedTaq-Polymerase		Sigma, Deisenhofen

Die Ansätze wurden in einem Thermocycler bei folgendem Programm vervielfältigt:

- 3 Min. bei 95°C
 - 45 Sek. bei 95°C
 - 45 Sek. bei 60°C
 - 2 Min. bei 72°C
 - 10 Min. bei 72°C
- } 30 Zyklen

Die amplifizierte DNA konnte nun entweder mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt oder bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Verwendete Primer:

Genprodukt:	Sequenz:	Produktgröße:
<i>Cre</i>	for: 5'-GAACGCACTGATTCGACCA-3' rev: 5'-AACCAGCGTTTCGTTCTGC-3'	200 bp
<i>Miz1</i>	for (Primer 1): 5'-GTATTCTGCTGTGGGGCTATC-3' rev (Primer 2): 5'-GGCTGTGCTGGGGGAAATC-3' rev (Primer 3): 5'-GGCAGTTACAGGCTCAGGTG-3'	siehe Abbildung 3.2-2 b

2.4 Proteinbiochemie

2.4.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Verwendete Lösungen:

• Benzonase®Nuclease	Verdünnung: 1:1000	Novagen, USA
• Proteinase-Inhibitor-Cocktail	Verdünnung: 1:1000	Sigma, Deisenhofen
• RIPA-Puffer		siehe Abschnitt 2.1.3

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen nach Versuchsende zuerst einmal mit PBS gewaschen. Nun wurde gekühlter, mit Proteinaseinhibitor versehener Lysispuffer zu den Zellen gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Untergrund abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um Proteinabbau durch Proteasen zu vermeiden, wurden die Proben permanent auf Eis gekühlt. Normalerweise wurde eine halbe 55cm²-Kulturschale oder ein Gefäß einer 6-Well-Platte in 500µl Lysispuffer geerntet. Da die Zelllysate wegen ihrem DNA-/RNA-Gehalt meist sehr viskös und dadurch schlecht zu pipettieren waren, wurden sie vor ihrer Weiterverarbeitung für

mindestens zwei Stunden mit Benzonase auf Eis inkubiert. Hierbei handelt es sich um eine Endonuklease, die alle Arten von Nukleinsäuren abbaut.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Assays

Verwendete Lösungen:

• Bicinchoninsäure		Sigma, Deisenhofen
• BSA		Roth, Karlsruhe
• Kupfersulfat-Pentahydrat	4%ig in ddH ₂ O	Merck, Darmstadt

Das Prinzip der BCA-Methode (Smith et al., 1985) beruht darauf, dass zweiwertige Kupferionen in wässrigem, alkalischem Milieu durch das Protein des Zelllysats zu einwertigem Kupfer reduziert werden. In einer ersten Reaktion werden Komplexe aus dem zweiwertigen Kupfer und der Proteinverbindung gebildet. Dabei findet ein Farbumschlag der Lösung von farblos nach hellviolett statt. Voraussetzung für diese Reaktion ist, dass die Proteinverbindung mindestens zwei Peptidbindungen enthält. In einer zweiten Reaktion findet eine Intensivierung des Farbumschlags zu kräftigem violett statt. Hier entsteht ein Komplex aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) und dem in der ersten Reaktion entstandenen einwertigen Kupfer-Ion. Die Absorption der BCA-Cu⁺-Komplexe kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen werden.

Indem nun der ermittelte Absorptionswert auf einer Eichkurve aufgetragen wurde, konnte auf die Proteinkonzentration eines Zelllysats zurückgeschlossen werden. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde in jedem BCA-Assay eine Standardreihe, die BSA-Mengen (bovines Serumalbumin) zwischen 0 und 5µg enthielt, mitgemessen. Um sicher zustellen, dass der gemessene Wert der Proteinlösung im linearen Bereich der Eichkurve liegt, wurden verschiedene Verdünnungen des Zelllysats gemessen (1:10, 1:30, 1:60 in H₂O). In einer 96-well-Platte wurden pro Well 35µl der Probenverdünnungen bzw. der BSA-Verdünnungsreihe vorgelegt. Dazu wurden in jedes Well 200µl einer Mischung aus Bicinchoninsäure und 2% Kupfersulfat-Pentahydrat pipettiert. Im Anschluss wurde im Tecan-Reader die Absorption bei 562nm und 37°C nach 0, 15 und 30 Minuten gemessen. Für jede Probe wurden zwei Messungen durchgeführt. Mit Hilfe des Programms Excel konnte für jeden Messzeitpunkt die technischen Duplikate gemittelt und anschließend der Mittelwert der drei Zeitpunkte, sowie die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mit Hilfe der SDS-Page können Proteingemische in ihre Komponenten aufgetrennt werden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass geladene Teilchen im elektrischen Feld wandern. Damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Einzelkomponenten möglichst nur von einem Faktor, nämlich der Molekülgröße abhängt, müssen die Proteinproben mit einem Probenpuffer vorbehandelt werden. Der Probenpuffer enthält unter anderem Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol. Bei dem SDS handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das in einem konstanten Verhältnis zur Proteinmasse (1,4 g SDS/g Protein) an das Protein der Lösung bindet und durch seine negative Ladung die Eigenladung des Proteins maskiert. Durch das β -Mercaptoethanol werden die Disulfid-Brücken der Proteinkomplexe aufgespalten. Unter Erhitzen auf 95°C bewirkt der Probenpuffer die Denaturierung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Die Proteine liegen nun als langgestreckte Polypeptidketten vor, deren Masse und Ladung proportional zu ihrer Größe sind.

Für die Auftrennung des Proteingemischs wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach Lämmli verwendet (Laemmli, 1970). Dieses Gelsystem besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße unterscheiden. Aufgabe des Sammelgels ist es, die Proteinproben an der Grenze zum Trenngel zu einer scharfen Bande zu konzentrieren. Der Sammelgelpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 enthält Chloridionen, die durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld schnell wandern und somit als Leitonen fungieren. Der Laufpuffer enthält Glycin, das bei dem pH-Wert des Sammelgels als Zwitterion vorliegt und damit wegen seiner geringen Mobilität das Folgeion darstellt. Durch die großen Poren des Sammelgels tritt hier kein Siebeffekt ein und die negativ geladenen Proteine ordnen sich als schmale Bande zwischen den beiden Ionen-Fronten an. Am Übergang vom Sammel- zum Trenngel ändert sich plötzlich der pH-Wert des Gels zu 8,8, wodurch das Glycin eine negative Ladung erhält. Wegen seiner kleinen Molekülgröße können die Glycinationen nun die Proteine überholen, was zu einer weiteren Verschärfung der Proteinbande führt. Die negativ geladenen, ankonzentrierten Proteinmoleküle wandern nun ins Trenngel, wo sie wegen der engmaschigen Poren der Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins werden Gele mit unterschiedlichem Acrylamidanteil (6-18%) verwendet. Für kleinere Proteine eignen sich konzentrierte Gele, für große Proteine weniger konzentrierte. Die verwendete Gelapparatur bestand aus zwei Glasplatten, Abstandhaltern (1,5 mm), Probenkämme und einer Haltevorrichtung. Die Bestandteile wurden vor der Benutzung gründlich mit 70%igem Alkohol gereinigt. Dann erfolgte die Vorbereitung der Gel-Lösungen, wobei das APS und das TEMED,

die die Polymerisation des Gels starten, erst unmittelbar vor dem Eingießen in die Gelapparatur zugegeben wurden.

Zusammensetzung der Gele:

	Sammelgel	Trenngel 8%	
	(2ml):	(10ml):	
• ddH₂O	1,4 ml	4,6 ml	
• 30% Acrylamidmix (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1)	0,33 ml	2,7 ml	Roth, Karlsruhe
• 1 M Tris-Puffer (pH 6,8)	0,25 ml		siehe Abschnitt 2.1.3
• 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)		2,5 ml	siehe Abschnitt 2.1.3
• 10% SDS-Lösung	0,02 ml	0,1 ml	siehe Abschnitt 2.1.3
• 10% APS-Lösung	0,02 ml	0,1 ml	siehe Abschnitt 2.1.3
• TEMED	0,002 ml	0,006 ml	BioRad, München

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und sofort mit ein wenig Isopropanol überschichtet, damit die Oberfläche möglichst glatt wurde. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Das Aufsetzen eines Probenkamms führte zur Aussparung der Probenaschen im Gel. Als das ganze Gel vollständig polymerisiert war, wurde es in eine Laufapparatur in einer Elektrophoresekammer eingespannt, welche mit Lämmli-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die Proteinproben wurden mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer bei 95°C für fünf Minuten erhitzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Um später Aussagen über das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine treffen zu können, wurde in eine Tasche 10 µl Proteinmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, St.Leon-Rot) geladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel.

2.4.4 Western Blot

Im Western Blot erfolgt der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Gel auf eine geeignete Membran, indem ein elektrisches Feld, das senkrecht zu Gel und Membran wirkt, angelegt wird. Entsprechend dem Muster im Gel nach der SDS-Page sind die Proteine nach dem Blot-Vorgang auf der Membran fixiert und für weitere Analysen zugänglich. Der Transfer wurde als Halbtrocken-Blot ausgeführt. Dazu wurden eine PVDF-Membran und zwei dicke Filterpapiere entsprechend der Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für zehn Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit den Filterpapieren und dem Gel für 15 Minuten in Blot-Puffer inkubiert.

Danach wurden die einzelnen Blot-Komponenten nach folgendem Schema in der Blot-Kammer aufgeschichtet:

Anode – Filterpapier – PVDF-Membran – Gel – Filterpapier – Kathode

Die optimale Stromstärke für den Transfer wurde anhand der Gelgröße berechnet ($2,5 \text{ mA/cm}^2$). Der Transfervorgang dauerte 45 Minuten. Um nach Abschluss des Blottens die PVDF-Membran vor dem Austrocknen zu schützen, wurde diese in einer Schale mit TBST feucht gehalten.

2.4.5 Immundetektion

Verwendete Lösungen:

• Blocklösung	5% Milchpulver (w/v) in TBST	Roth, Karlsruhe
• Chemolumineszenz-Substratlösung	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lumi-Light Western Blotting Substrate ○ Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate 	Roche, Mannheim
• Entwicklerlösung	Neutol Liquid NE	Agfa, Belgien
• Fixierlösung	Sistan Image Silver Stabelizer	Agfa, Belgien
• TBS		siehe Abschnitt 2.1.3
• TBST		siehe Abschnitt 2.1.3

Primärantikörper:

• c-Myc (D84C12) XPTM	Spezies: Kaninchen Verdünnung: 1:500 in Blocklösung	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
• Miz1 (B10)	Spezies: Maus Verdünnung: 1:300 in Blocklösung	Santa Cruz, USA
• α-Tubulin (Prod#62204)	Spezies: Maus Verdünnung: 1:5000 in Blocklösung	Thermo Scientific, Karlsruhe

Sekundärantikörper:

• Anti-Kaninchen IgG-HRP	Spezies: Ziege Verdünnung: 1:7500 in Blocklösung	BioRad, München
• Anti-Maus IgG-HRP	Spezies: Ziege Verdünnung: 1:7500 in Blocklösung	BioRad, München oder: Pierce, Thermo Scientific, Karlsruhe

Anhand spezifischer Antikörper können nun selektiv bestimmte Proteine auf der Blot-Membran nachgewiesen werden. Dabei binden, genau wie bei der Immunfärbung von Zellen, spezifische

Erstantikörper an Epitope des gewünschten Proteins, welche dann im nächsten Schritt durch einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper dargestellt werden können. In dieser Arbeit wurden Sekundärantikörper verwendet, die an das Enzym Meerrettichperoxidase gebunden waren. Durch die Zugabe von Luminol und H_2O_2 wurde an Stellen der Membran, wo der Zweitantikörper gebunden hatte, Chemilumineszenz erzeugt. Dabei katalysierte die Peroxidase die Oxidation von Luminol, was zur Entstehung des Lichts führt. H_2O_2 wirkte dabei als Oxidationsmittel.

Unmittelbar nach Beendigung des Blottens wurde die mit Proteinen beladene Membran für 45 Minuten auf einem Wippschüttler in Blocklösung inkubiert. Sinn des Blockens ist es, unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper auf der Membran abzusättigen, um damit möglichen dunklen Hintergrund und unspezifische Banden zu vermeiden. Anschließend wurde der in Blocklösung verdünnte Antikörper über Nacht dazugegeben. Hierzu wurde die Membran in eine passende Folie mit 2 ml Primärantikörperlösung eingeschweißt und zwischen zwei Glasplatten, die für eine gleichmäßige Verteilung der Antikörperlösung sorgten, im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperverdünnung entfernt und die Membran dreimal für zehn Minuten schwenkend mit TBST gewaschen. In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnung des Zweitantikörpers in Blocklösung hergestellt. Darin wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für je zehn Minuten mit TBST und einmal für 15 Minuten mit TBS gewaschen. Nun wurde die Membran auf einer Folie für fünf Minuten in 1 ml frisch angesetzter Chemilumineszenz-Substratlösung inkubiert. Anschließend konnte die Chemilumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden. Dazu wurde der Film durch die Membran in einer Röntgenkassette je nach Primärantikörper für eine bestimmte Zeit belichtet, bevor er entwickelt wurde. Die Entwicklung erfolgte in einer Dunkelkammer, wobei der Film zuerst solange in Entwicklerlösung inkubiert wurde, bis sich die Proteinbanden zeigten. Danach wurde der Film kurz in Wasser abgewaschen und anschließend in ein Fixierbad getaucht, wodurch der Röntgenfilm durchsichtig wurde.

Um zu zeigen, dass in alle Geldaschen die gleiche Proteinmenge geladen wurde, erfolgte eine Ladekontrolle. Hierfür wurde die Membran nach der Chemilumineszenzreaktion dreimal in TBST gewaschen und über Nacht mit einem Primärantikörper gegen Tubulin inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann eine erneute Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper und die Detektion der Chemilumineszenzreaktion.

3 Ergebnisse

3.1 Autophagie in den Brustdrüsenzellen HC11 in Abhängigkeit von Miz1

3.1.1 Die Zelllinie HC11

Bei der HC11-Zelllinie handelt es sich um epitheliale Maus-Brustdrüsenzellen (Ball et al., 1988). Diese adhären wachsenden Zellen können durch eine kombinierte Behandlung mit den Hormonen Prolaktin, Insulin und Dexamethason differenzieren und zur Laktation angeregt werden. Dabei produzieren die Zellen unter anderem vermehrt Milch-Proteine (z.B. Kasein, siehe Abb. 3.1-1), deren Expression durch semiquantitative PCR dargestellt werden kann. In dieser Arbeit wurde allerdings nur mit undifferenzierten Zellen gearbeitet.

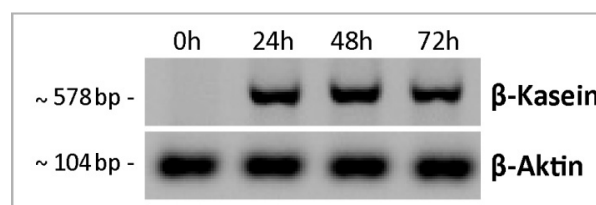


Abbildung 3.1-2-1: Expression des Differenzierungsmarkers β -Kasein. Die Expression von β -Kasein wurde mittels semiquantitativer PCR ermittelt. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 24, 48 und 72 Stunden nach Beginn der Hormonbehandlung entnommen. Die β -Kasein-Bande nimmt im Verlauf der Behandlung zu, wodurch auf eine erfolgreiche Differenzierung geschlossen werden kann. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

3.1.2 Autophagie in HC11-Zellen

3.1.2.1 Methoden zur Induktion von Autophagie

Es gibt verschiedene Methoden, in Zellen Autophagie zu stimulieren. Eine Möglichkeit besteht darin, den Zellen Nährstoffe, insbesondere Aminosäuren, zu entziehen (Mitchener et al., 1976). In der Zellkultur ist das möglich, indem die Zellen an Stelle von Vollmedium, mit *Earle's balanced salt solution* (EBSS) oder *Hank's balanced salt solution* (HBSS) behandelt werden. Hierbei handelt es sich um salzhaltige Puffer, die keine Aminosäuren enthalten. Um festzustellen, welches der beiden Hungermedien zur Induktion von Autophagie in HC11-Zellen besser geeignet ist, wurden die Zellen in Lab-Tek®s kultiviert und für sechs Stunden mit EBSS, HBSS und normalem Nährmedium mit und ohne lysosomale Inhibitoren inkubiert. Zur Beurteilung der Ausbildung von Autophagosomen, wurde das Autophagie-Markerprotein LC3 immunozytochemisch angefärbt.

Zellen, die in normalem Nährmedium inkubiert wurden, zeigten eine weitgehend homogene LC3-Färbung im zytoplasmatischen Raum, welche um den Zellkern teilweise intensiver erschien (Abbildung 3.1-2 a). Man sah vereinzelt LC3-Punkte, wobei diese bei Zusatz von Inhibitoren vermehrt auffindbar (Abbildung 3.1-2 d) waren. Zellen, die in EBSS inkubiert wurden, zeigten eine deutliche Zunahme LC3-positiver Punkte (=LC3-Punkte) im Vergleich zu Zellen, die mit Medium inkubiert wurden. Die Punkte fanden sich über das ganze Zytoplasma verteilt. Dies war sowohl mit, als auch ohne Zusatz von Inhibitoren der Fall (Abbildungen 3.1-2 b+e).

Mit HBSS behandelte Zellen zeigten ein stark verschmälertes, teilweise sogar gar kein Zytoplasma und wirkten abgerundet im Vergleich zu den Zellen, die mit Vollmedium inkubiert wurden. Auch hier ließ sich eine Zunahme der LC3-Punkte, im Vergleich zur Medium-Bedingung, vor allem kernnah, erkennen. Dies galt sowohl für Zellen, die mit, als auch für die, die ohne Inhibitoren behandelt wurden. Allerdings erschien die autophagische Aktivität dieser Zellen durch das schmale Zytoplasma schlechter beurteilbar, als bei den mit EBSS stimulierten Zellen.

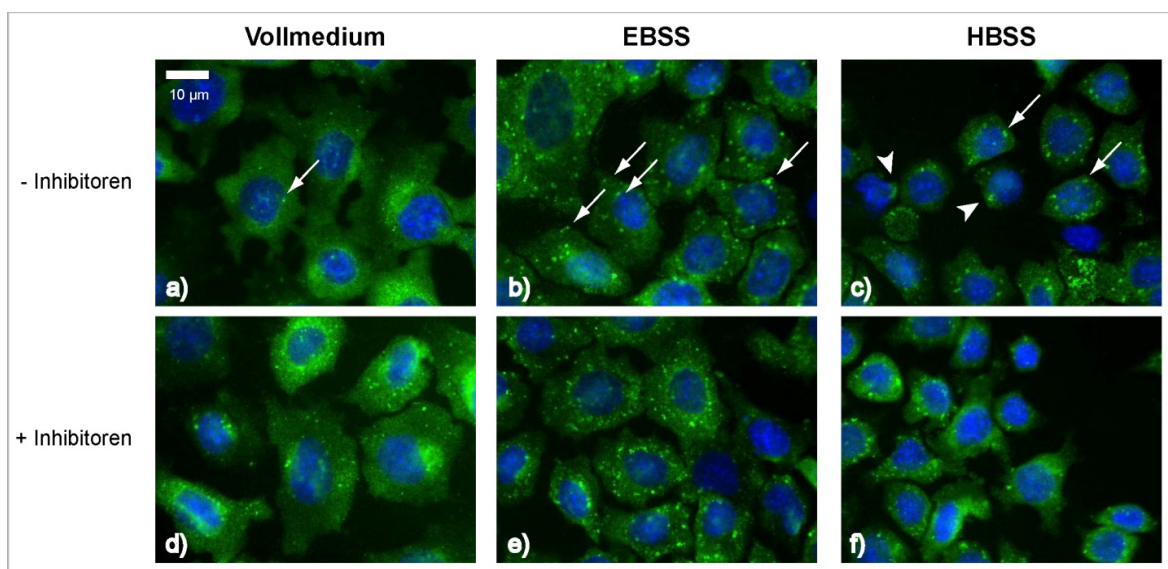


Abbildung 3.1-2: Autophagie-Induktion durch EBSS und HBSS. HC11-Zellen wurden in Lab-Tek[®]s jeweils für 6 h mit Vollmedium (a + d), EBSS (b + e) und HBSS (c + f), mit (d – f) und ohne lysosomale Inhibitoren (a – c), inkubiert. Die LC3-Färbung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blau). Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft auf LC3-Punkte, die Pfeilspitzen auf den schmalen Zytoplasmasaum der in HBSS inkubierten Zellen.

Weiterhin lässt sich auch unabhängig von der Nährstoffsituation der Zelle durch Rapamycin Autophagie induzieren (Noda and Ohsumi, 1998 ; siehe Abschnitt 1.1.2 a). Deshalb wurden in einem weiteren Versuch Zellen in LabTek[®]s mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 nM, 150 nM und

200 nM) Rapamycin und Kontrollzellen mit der entsprechenden Konzentration DMSO für drei Stunden inkubiert.

Es fiel auf, dass bereits Zellen, die in Vollmedium inkubiert wurden einige LC3-Punkte aufwiesen (Abbildung 3.1-3 a+c). Hierbei könnte es sich zusätzlich zur basalen autophagischen Aktivität der Zellen eventuell um einen Effekt des DMSO handeln. Kontrollzellen, die zusätzlich mit lysosomalen Inhibitoren inkubiert wurden, zeigten teilweise vor allem in der Nähe des Zellkerns etwas mehr LC3-Punkte, als in der Bedingung ohne Inhibitoren. Wie in Abbildung 3.1-3 b und d zu sehen ist, nahm die Anzahl der LC3-Punkte durch die Behandlung mit Rapamycin kaum zu. In den Zellen, die mit verschiedenen Rapamycin-Konzentrationen behandelt wurden, ließen sich keine Unterschiede bezüglich der autophagischen Aktivität feststellen (nicht dargestellt). Auch unter der Bedingung Rapamycin mit Inhibitoren war die Anzahl der LC3-Punkte im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht (Abbildung 3.1-3 d).

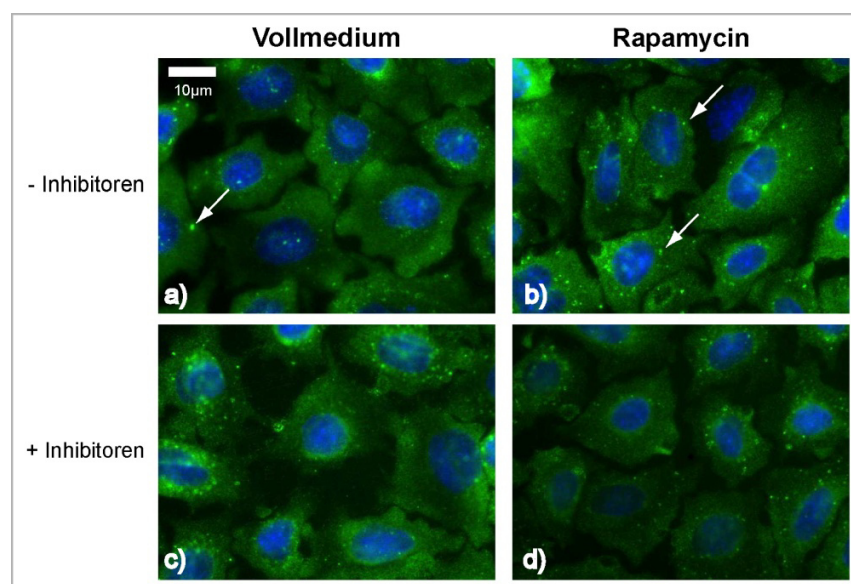


Abbildung 3.1-3: Autophagie-Induktion durch Rapamycin. HC11-Zellen wurden in LabTek®s jeweils für 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Rapamycin (dargestellt nur 150 nM (b + d)), sowie als Kontrolle in Vollmedium mit DMSO (a + c), jeweils mit (c + d) und ohne Inhibitoren (a + b), inkubiert. Die LC3-Färbung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt. Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft auf LC3-Punkte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HBSS und Rapamycin zum Studium der Autophagie in HC11-Zellen nicht geeignet erscheinen. Da sich die Zunahme der LC3-Punkte und damit auch der Anstieg der autophagischen Aktivität in Zellen, die mit EBSS stimuliert wurden, am besten beobachten ließ, wurde dieses für alle Experimente der folgenden Arbeit zur Autophagie-Induktion verwendet.

3.1.3 Genexpressionsanalysen in Zellen, die mit EBSS stimuliert wurden

Um nachvollziehen zu können, ob die Stimulation von Autophagie durch EBSS selbst bereits einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene hat, wurden Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit EBSS stimuliert. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 1, 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden) Proben gewonnen, RNA daraus isoliert und cDNA hergestellt, welche mittels qPCR analysiert werden konnte. Die qPCR-Rohdaten wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet (Livak and Schmittgen, 2001; siehe Abschnitt 2.3.5). Als Kontrolle dienten Zellen, die zum Zeitpunkt 0 vor der Zugabe von EBSS geerntet wurden. Die in dieser Kontroll-Bedingung gemessene Expression eines Gens wurde mit 1 gleichgesetzt und die ermittelten Expressionen in allen anderen Bedingungen mit diesem verglichen und als die n-fache Expression dieses Gens dargestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Zuerst sollte gezeigt werden, dass die Zellen in diesem Experiment erfolgreich zur Autophagie stimuliert wurden. Dazu wurde die Expression einiger Autophagie-assoziiierter Gene untersucht. Da sich in den HC11-Zellen nicht alle Atg-Gene durch EBSS induzieren ließen, sind hier beispielhaft nur *Atg9b* und *Atg10* dargestellt.

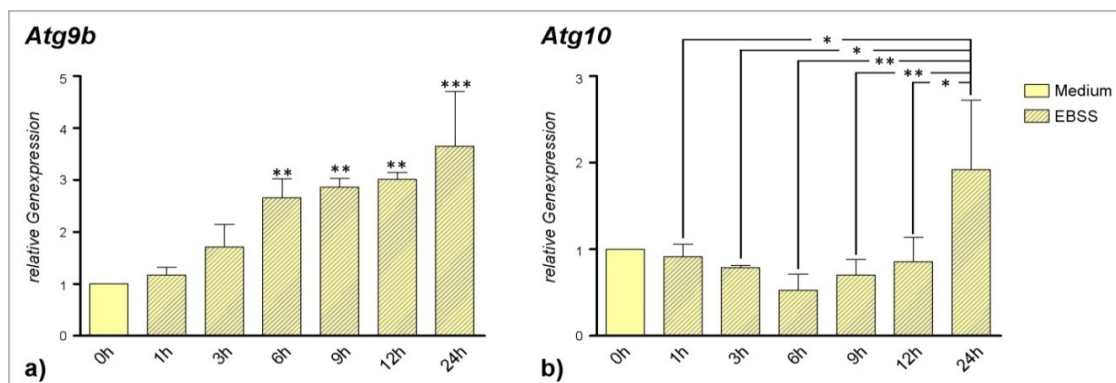


Abbildung 3.1-4: *Atg9b*- und *Atg10*-Expression im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit EBSS. HC11-Zellen wurden für 1-24 h in EBSS inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden zu den gezeigten Zeitpunkten Zellen geerntet. In der Abbildung wurden der Mittelwert, sowie die Standardabweichung der biologischen Replikate dargestellt. Die Signifikanz wurde in einer einfaktoriellem ANOVA-Analyse mit anschließendem Tukey-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$. In Graph a) beziehen sich die durch Sterne markierten Unterschiede auf die Kontrolle (0h), in Graph b) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Kontrolle, wohl aber innerhalb der späteren Zeitpunkte.

Bei *Atg9* handelt es sich um ein Transmembranprotein, das vor allem bei der Bildung der Phagophore eine wichtige Rolle spielt (Zavodszky et al., 2013; siehe Abschnitt 1.1.1.4). In Abbildung 3.1-4 a sieht man, wie die Expression von *Atg9b* durch die zunehmende Inkubationsdauer mit EBSS kontinuierlich

anstieg und nach 24 Stunden beinahe den Faktor 4 erreichte. Allerdings wurde *Atg9b* in den Zellen insgesamt nur sehr schwach exprimiert. *Atg10* ist Bestandteil des Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystems in dem *Atg12* auf *Atg5* übertragen wird (Shintani et al., 1999; siehe Abschnitt 1.1.1.5). In Abbildung 3.1-4 b ist zu erkennen, dass in den ersten zwölf Stunden der EBSS-Behandlung die *Atg10*-Expression anfangs (bis nach sechs Stunden) leicht abnahm und nach zwölf Stunden in etwa wieder auf den Ausgangswert zurückkehrte. Nach 24 Stunden stieg die Expression von *Atg10* auf das Zweifache an. Auch die Expression von *Atg5* im Zeitverlauf wurde in diesem Experiment untersucht (nicht dargestellt), allerdings lies sich keine Induktion durch EBSS feststellen.

Da in dieser Arbeit der Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf den Prozess der Autophagie untersucht werden soll, stellt sich zuerst die Frage ob sich die Expression von *Miz1* durch die Stimulation mit EBSS verändert. Bereits in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe (Oppenheimer, 2009; Webert, 2011; Berliner 2012) gab es Hinweise, dass sich in MEFs und in der Rattenpankreas-Zelllinie AR4-2J die Expression von *Miz1* erhöht, wenn diese Zellen für sechs Stunden mit EBSS behandelt werden. Es sollte nun untersucht werden, ob sich diese Beobachtungen auch in HC11-Zellen reproduzieren lassen und wie sich die *Miz1*-Expression im zeitlichen Verlauf darstellt.

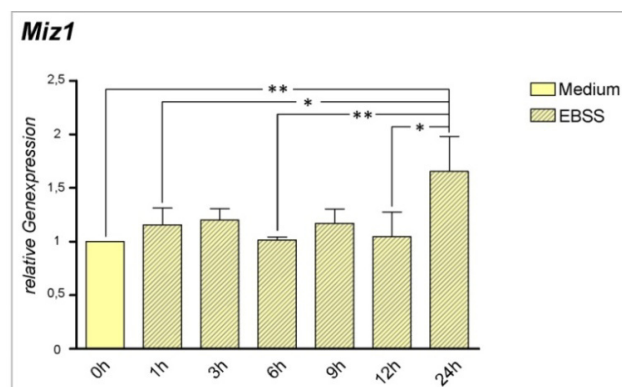


Abbildung 3.1-5: Miz1-Expression im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit EBSS. HC11-Zellen wurden für 1-24 h in EBSS inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden zu den gezeigten Zeitpunkten Zellen geerntet. In der Abbildung wurden der Mittelwert, sowie die Standardabweichung der biologischen Replikate dargestellt. Die Signifikanzen wurden in einer einfaktoriellem ANOVA-Analyse mit anschließendem Tukey-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

In den HC11-Zellen zeigte sich in diesem Experiment kein Anstieg der *Miz1*-Expression nach sechs und auch nicht nach zwölf Stunden, wohl aber ein leichter Anstieg nach 24 Stunden auf das in etwa 1,7 fache (siehe Abb. 3.1-5).

Da der Transkriptionsfaktor Myc ein wichtiger Interaktionspartner von Miz1 ist, wurde im selben Experiment auch die Expression von diesem Gen gemessen.

Die Expression von *Myc* fiel in den ersten drei Stunden auf das circa 0,7-fache ab, stieg dann aber zwischen drei und sechs Stunden auf das Doppelte an und erreichte nach 24 Stunden einen durchschnittlichen Höchstwert von ungefähr 4-fach (siehe Abb. 3.1-6). Die relativ hohen Standardabweichungen bei den 6-, 9-, 12- und 24-Stunden-Werten ergeben sich dadurch, dass in einem der drei Experimente die Expression von *Myc* erst zwischen 12 und 24 Stunden induziert wurde und von dem 0,89-fachen auf das 4,3-fache anstieg. Möglicherweise haben ungewollte Veränderungen, wie z.B. dichter gewachsene Zellen bei Beginn der Stimulation zu diesem Ergebnis geführt. In dieser Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass in HC11-Zellen die Genexpression von *Myc* in wachsenden Zellen hochreguliert ist, wohingegen es in konfluenten Zellen herunterreguliert ist.

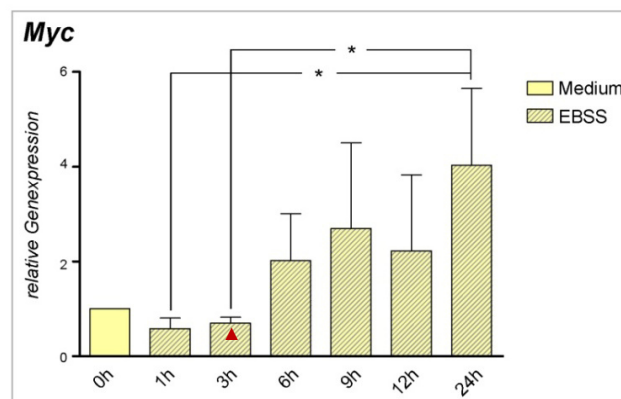


Abbildung 3.1-6: *Myc*-Expression im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit EBSS. HC11-Zellen wurden für 1-24 h in EBSS inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden zu den gezeigten Zeitpunkten Zellen geerntet. In der Abbildung wurden der Mittelwert, sowie die Standardabweichung der biologischen Replikate dargestellt. Die Signifikanz wurde in einer einfaktoriellem ANOVA-Analyse mit anschließendem Tukey-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Kontrolle, wohl aber innerhalb der späteren Zeitpunkte. Bei der mit dem roten Dreieck markierten Säule wurde wegen einer fehlerhaften Messung in einem Experiment der Wert eines technischen Replikats ausgeschlossen.

Außerdem wurde die Expression von *Cdkn1a* unter EBSS-Einfluss im Zeitverlauf untersucht. *Cdkn1a* kodiert für das Protein p21^{cip1}, welches durch seine inhibierende Wirkung wesentlich an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist. Die Expression von *Cdkn1a* wird durch die Interaktion von Myc und Miz1 gehemmt (Herold et al., 2002; siehe Abschnitt 1.2.2.2). Unter der Behandlung der Zellen mit EBSS zeigte die Expression von *Cdkn1a* einen bogenförmigen Verlauf (siehe Abb. 3.1-7). Zunächst nahm sie zu und erreichte ihre maximale Induktion von circa 2,5-fach zwischen drei und sechs Stunden. Danach fiel sie wieder leicht ab und pendelte sich zwischen 12 und 24 Stunden auf Werten von etwa 2-fach ein.

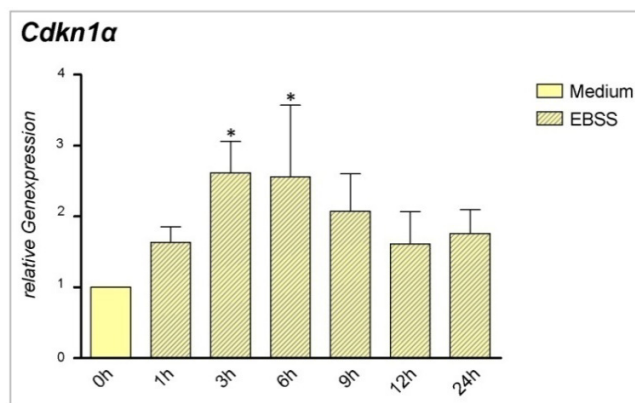


Abbildung 3.1-7: Cdkn1a-Expression im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit EBSS. HC11-Zellen wurden für 1-24h in EBSS inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden zu den gezeigten Zeitpunkten Zellen geerntet. In der Abbildung wurden der Mittelwert, sowie die Standardabweichung der biologischen Replikate dargestellt. Die Signifikanzen wurden in einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse mit anschließendem Tukey-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$. Die durch die Sterne markierten Unterschiede beziehen sich auf die Kontrolle (0h).

Anstelle von Kontroll-Proben, die jeweils für die gleiche Zeit wie die in EBSS behandelten Proben in normalem Nährmedium inkubiert wurden, wurde hier immer mit einer Kontroll-Probe, die zum Zeitpunkt 0, also vor der Zugabe des EBSS, gewonnen wurde, verglichen. Das geschah deshalb, weil beobachtet wurde, dass Zellen, die mit EBSS behandelt wurden, mit Beginn der Behandlung aufhörten zu wachsen. Im Unterschied dazu wuchsen die Zellen, die in Medium inkubiert wurden innerhalb der 24 Stunden natürlich normal weiter und waren nach Ablauf der Inkubationszeit beinahe konfluent. Da sich durch die Zunahme der Konfluenz der Zellen in Nährmedium Unterschiede in der Expression mancher Gene ergeben, können beim Vergleich zu den deutlich weniger konfluenten Zellen in EBSS (siehe Abbildung 3.1-8) Fehler entstehen.

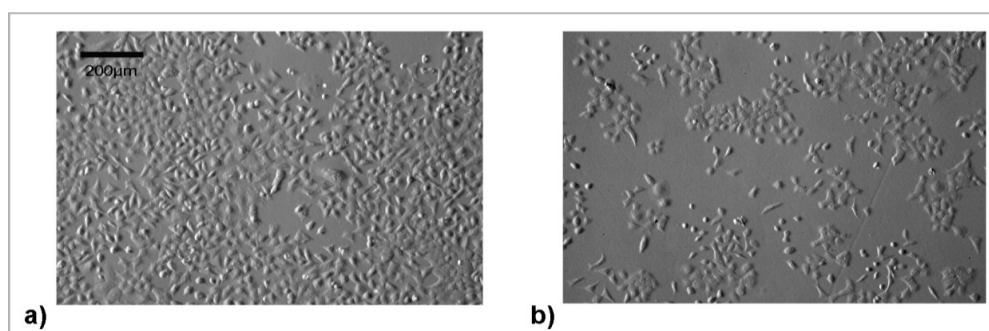


Abbildung 3.1-8: Zell-Wachstumsvergleich zwischen Vollmedium- und EBSS-Behandlung. HC11-Zellen wurden bei gleicher Ausgangskonfluenz zum einen für 24h mit normalem Nährmedium (a) und zum anderen für die gleiche Zeit mit EBSS (b) inkubiert.

Um zu zeigen, wie sich die Zunahme der Konfluenz der Zellen auf die Expression mancher Gene auswirkt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Da die Dichte von Zellen, die in normalem Nährmedium wachsen, innerhalb von 24 Stunden stark zunimmt, wurden für dieses Experiment

weniger dicht gewachsene Zellen (ca. 40-50% Konfluenz) als im obigen Experiment (ca. 80-90% Konfluenz) verwendet. Bei gleicher Ausgangskonfluenz wurden die Zellen dann zum einen mit Vollmedium und zum anderen mit EBSS inkubiert. Sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden wurden von beiden Bedingungen Zellen geerntet und RNA isoliert. Da dieses Experiment nur zweimal durchgeführt wurde, sind im Folgendem jeweils die Ergebnisse der beiden Experimente nebeneinander dargestellt. In diesem Experiment wurde die Expression eines Gens in der Probe, die aus Zellen, die sechs Stunden in normalem Nährmedium gewachsen waren, gleich 1 gesetzt und alle anderen gemessenen Werte mit diesem verglichen und als n-fache Expression dieses Gens dargestellt.

Die Expression von *Atg9b* stieg in beiden Versuchen durch die Behandlung mit EBSS innerhalb von sechs Stunden auf das in etwa 3-fache an und fiel bis zur 24 Stunden-Messung wieder ab. In Zellen, die in Medium wuchsen zeigte sich in beiden Experimenten eine minimale Herunterregulation der Expression von *Atg9b* zwischen sechs und 24 Stunden (siehe Abb. 3.1-9 a).

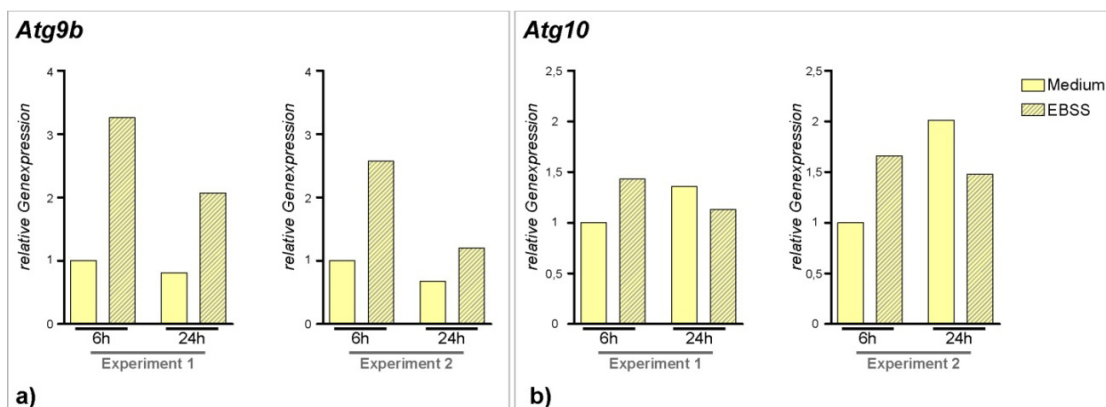


Abbildung 3.1-9: *Atg9b*- und *Atg10*-Expression nach Inkubation in EBSS bzw. in Medium nach 6 und 24h. HC11-Zellen wurden für 6 und 24 h in EBSS oder Vollmedium inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der beiden unabhängigen Experimente.

Die Expression von *Atg10* ließ sich in diesem Experiment durch EBSS nach sechs Stunden nur leicht induzieren und fiel nach 24 Stunden wieder leicht ab. Auffällig war, dass die Expression von *Atg10* auch in Medium nach 24 Stunden anstieg und in Versuch 2 sogar höhere Werte erreichte als in EBSS-Konditionen (siehe Abb. 3.1-9 b).

Bei den Messungen von *Miz1* fiel auf, dass in beiden Versuchen die Expression von *Miz1* bereits nach sechs Stunden auf über das Doppelte anstieg und nach 24 Stunden wieder in etwa auf den Ausgangswert abfiel (siehe Abb. 3.1-10). Scheinbar lässt sich in weniger konfluenten Zellen die Expression von *Miz1* durch EBSS schneller und stärker induzieren, als in dichter gewachsenen Zellen. Zellen, die in Medium wuchsen, zeigten keine Veränderung der Miz1-Expression im Zeitverlauf.

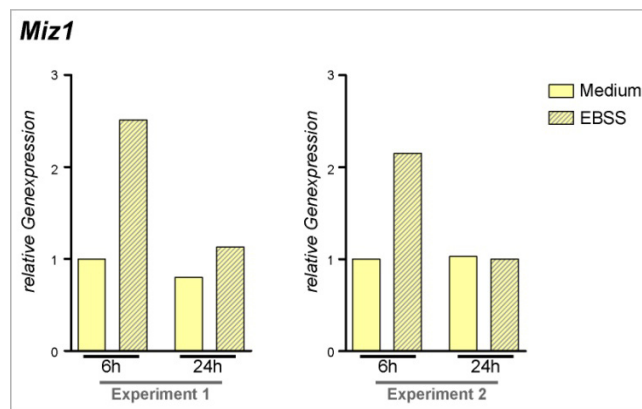


Abbildung 3.1-10: Miz1-Expression nach Inkubation in EBSS bzw. in Medium nach 6 und 24h. HC11-Zellen wurden für 6 und 24h in EBSS oder Vollmedium inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der beiden unabhängigen Experimente.

Die mRNA-Level von *Myc* stiegen in Versuch 1 unter EBSS-Behandlung kontinuierlich auf Werte von ca. 8-fach, in Versuch 2 stiegen sie zunächst bis sechs Stunden in etwa gleichermaßen an, fielen dann aber bis nach 24 Stunden wieder leicht ab (siehe Abb. 3.1-11). Die Werte sind in beiden Experimenten höher als im obigen Experiment, so dass auch hier angenommen werden kann, dass sich auch die Expression von *Myc* in weniger konfluenten durch EBSS stärker induzieren lässt. Die Zellen, die in normalem Nährmedium gewachsen waren, zeigten ebenfalls einen Anstieg der *Myc*-Expression auf circa das Doppelte.

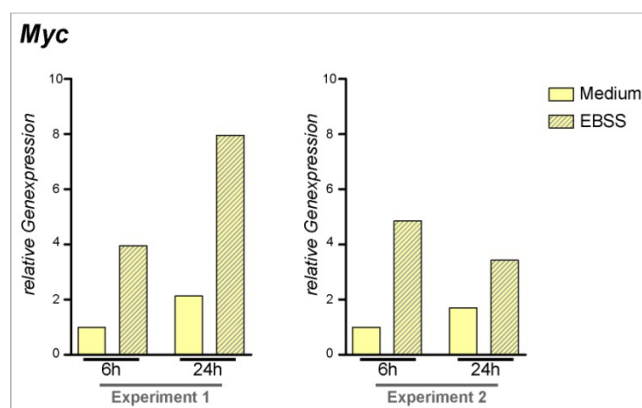


Abbildung 3.1-11: Myc-Expression nach Inkubation in EBSS bzw. in Medium nach 6 und 24h. HC11-Zellen wurden für 6 und 24h in EBSS oder Vollmedium inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der beiden unabhängigen Experimente.

Die Expression von *Cdkn1a* stieg in beiden Versuchen unter EBSS-Einfluss innerhalb von sechs Stunden um das 3-4-fache an und fiel dann zwischen sechs und 24 Stunden wieder ab, in Versuch 2 sogar auf den Ausgangswert. Diese Beobachtungen deckten sich mit denen des obigen Experiments (vergleiche Abbildung 3.1-7 und 3.1-12). Zellen, die in Nährmedium wuchsen, zeigten keine Expressionsunterschiede im zeitlichen Verlauf.

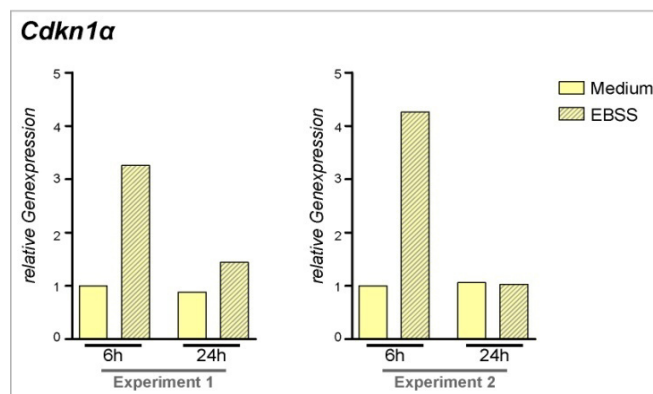


Abbildung 3.1-12: Cdkn1a-Expression nach Inkubation in EBSS bzw. in Medium nach 6 und 24h. HC11-Zellen wurden für 6 und 24h in EBSS oder Vollmedium inkubiert. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der beiden unabhängigen Experimente.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von *Atg9b*, *Atg10*, *Miz1*, *Myc* und *Cdkn1a* in HC11-Zellen durch EBSS positiv reguliert wird. Die Induzierbarkeit der Expression von *Miz1* und *Myc* durch EBSS ist wohl abhängig von der Konfluenz der Zellen zu Versuchsbeginn und ließ sich in weniger konfluenten Zellen stärker induzieren, als in dicht Gewachsenen. Die Änderung der Zelldichte im Zeitverlauf unter Wachstumsbedingungen in normalem Nährmedium beeinflusst in diesen Zellen die Expression von *Myc*, *Atg10* und *Atg9b*. *Myc* und *Atg10* wurden im zeitlichen Verlauf stärker exprimiert, wohingegen *Atg9b* leicht herunterreguliert wurde. Um statistische Aussagen treffen zu können, müsste das Experiment noch mindestens ein drittes Mal wiederholt werden. Weiterhin wäre es interessant gewesen, eine Probe zum Zeitpunkt 0, vor der Induktion von Autophagie, zu entnehmen, um zu sehen, ob sich in der Zeitspanne zwischen 0 und sechs Stunden Expressionsunterschiede ergeben.

3.1.4 Darstellung der Miz1-Expression auf Proteinebene in Zellen, die mit EBSS stimuliert wurden

Um zu überprüfen, ob sich der Effekt von EBSS auf die Expression von *Miz1* auch auf Proteinebene bemerkbar macht, wurden erneut Zellen für 24 Stunden in EBSS inkubiert. Vor Zugabe des EBSS, also zum Zeitpunkt 0, sowie nach 1, 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden wurden Gesamtzelllysate gewonnen. Diese wurden mittels SDS-Page aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Detektion von *Miz1* mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und einem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper im Immunblot (siehe Abschnitt 2.4). Mit dem hier verwendeten Antikörper lässt sich *Miz1* als eine ungefähr 75 kDa große Bande darstellen.

Vergleicht man die Proteinbanden in Abbildung 3.1-13 untereinander und zur Ladekontrolle, fand sich eine leichte Zunahme von Miz1 zwischen 0 und einer Stunde. Die übrigen Miz1-Banden zeigten sich in etwa gleich stark, wobei zwischen 12 und 24h erneut ein schwacher Anstieg des Miz1-Proteins zu verzeichnen war.

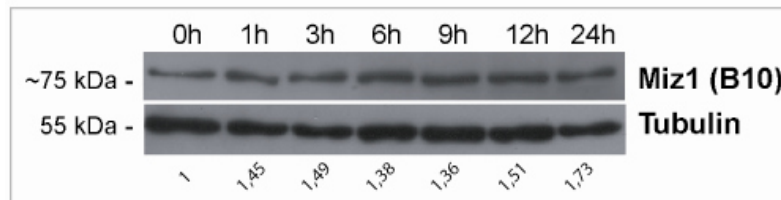


Abbildung 3.1-13: Darstellung von Miz1 nach EBSS-Behandlung im Westernblot. HC11-Zellen wurden für 1-24 h in EBSS inkubiert und zu den gezeigten Zeitpunkten geerntet. In einem 8%igen SDS-Gel wurden jeweils 50 µg des Gesamtzelllysats aufgetrennt und danach auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit Hilfe eines spezifischen Primärantikörpers gegen Miz1 und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde Miz1 nachgewiesen. Für die Ladekontrolle wurde ein spezifischer Primärantikörper gegen Tubulin verwendet. Unter den Blots ist die densitometrische Signalstärke der Miz1-Banden als n-fache Induktion im Vergleich zum Zeitpunkt 0h dargestellt.

Vielleicht würde sich auf Proteinebene eine deutlichere positive Regulation von Miz1 zeigen, wenn die Zellen noch länger als 24 Stunden in EBSS inkubiert worden wären oder weniger dicht gewachsene Zellen für den Versuch verwendet worden wären.

3.1.5 Infektion von HC11-Zellen mit Myc-, MycVD-, Miz1-, shMiz1-, pBABEpuro- und shScr-Vektoren

Um den Einfluss von Miz1 auf Autophagie nun etwas genauer untersuchen zu können, wurden HC11-Zellen mit verschiedenen Konstrukten retroviral infiziert. Der direkte Einfluss von Miz1 sollte zum einen in Zellen, die permanent Miz1 überexprimieren, und zum anderen in einer stabilen Miz1-Knockdown-Zelllinie untersucht werden. Die stabile Suppression von Miz1 wurde durch short hairpin-RNA-Interferenz erreicht. Durch die Überexpression von Myc und MycVD (=MycV394D) konnte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen Miz1 und Myc für den autophagischen Prozess wichtig ist. MycVD unterscheidet sich von normalem Myc durch eine Punktmutation, die zur Folge hat, dass im Myc-Protein an Position 394 die Aminosäure Aspartat durch Valin ersetzt ist. Das führt dazu, dass Miz1 nicht mehr an Myc binden kann, wobei aber die biologische Aktivität von Myc als Transkriptionsfaktor trotzdem erhalten bleibt (Herold et al., 2002). Bei den pBABEpuro- und pBABEshScr-Vektoren handelt es sich um Kontrollvektoren. Die bereits infizierten Zellen wurden größtenteils freundlicherweise von Adrián Sanz Moreno (AG Elsässer) zur Verfügung gestellt.

3.1.5.1 Überprüfung der Konstrukte auf Proteinebene

Für die Überprüfung der Konstrukte wurden nach Abschluss der Selektion dreimal jeweils nach dem Passagieren der infizierten Zellen, Gesamtzelllysate hergestellt und mittels SDS-Page aufgetrennt. Durch spezifische Antikörper gegen Miz1 und Myc sollte nachgewiesen werden, ob die Infektion erfolgreich war.

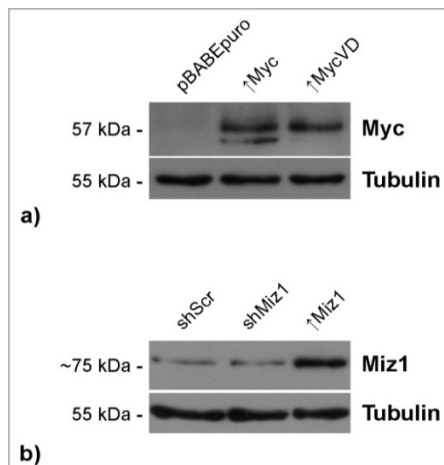


Abbildung 3.1-14: Miz1- und Myc-Expression nach retroviraler Infektion. HC11-Zellen wurden mit den dargestellten Konstrukten retroviral infiziert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate gewonnen und in einem 8%-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit spezifischen Primärantikörpern gegen Miz1 (b) und Myc (a) und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die jeweiligen Proteine nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde ein spezifischer Primärantikörper gegen Tubulin verwendet.

Die Überexpression von Myc und MycVD ließ sich im Westernblot gut darstellen (siehe Abbildung 3.1-14 a). Beide Konstrukte wurden in etwa gleich stark exprimiert. Auch die Überexpression von Miz1 konnte gezeigt werden. Der Miz1-Knockdown ließ sich auf Proteinebene allerdings nicht nachvollziehen (siehe Abbildung 3.1-14 b).

3.1.5.2 Überprüfung der Konstrukte auf RNA-Ebene

Gemeinsam mit den Protein-Proben wurden auch Proben für RNA-Untersuchungen genommen. Da auf Proteinebene der Miz1-Knockdown nicht sichtbar war, wurde die Expression der mRNA gemessen. Dazu wurden Primer für murines Miz1 verwendet (siehe Abb. 3.1-15). Im Vergleich zu den shScr-Zellen zeigten die shMiz1-Zellen einen durchschnittlichen Miz1-Knockdown von 30%. Dieser Knockdown ist vermutlich zu schwach, um eine Suppression von Miz1 auf Proteinebene zu bewirken. Das ist bei der Bewertung der folgenden Experimente zu berücksichtigen.

Die relative Überexpression von Miz1, Myc und MycVD ließ sich auf RNA-Ebene nicht berechnen, da es sich bei den Konstrukten jeweils um humane Sequenzen handelt, die in murinen Zellen überexprimiert wurden. Daher wurde nur die Überexpression von Miz1 mit Hilfe von Primern für humanes Miz1, auf RNA-Ebene analysiert. Da humanes Miz1 in Mauszellen natürlicherweise nicht vorkommt, lässt sich für die Kontrollbedingung kein ΔCt und somit auch keine relativen

Expressionsunterschiede zwischen Kontrolle und der Überexpressionsbedingung berechnen. Die ΔCt -Werte für humanes Miz1 betrug in den überexprimierenden Zellen im Durchschnitt 3.92.

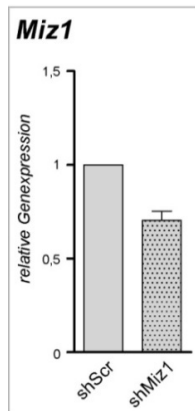


Abbildung 3.1-15: Miz1-Genexpression in Miz1-Knockdown-Zellen.

HC11 Zellen wurden mit short-hairpin-RNA gegen Miz1, sowie einem short-hairpin-Scrambled-Konstrukt als Kontrolle infiziert. Nach Selektion der Zellen durch Puromycin wurde in Abständen von ca. fünf Tagen dreimal RNA isoliert, aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Um die permanente Suppression von Miz1 nachzuweisen, wurde die cDNA mittels Realtime-PCR analysiert. In der Abbildung sind der Mittelwert und die Standardabweichung der 3 biologischen Replikate dargestellt.

3.1.5.3 Überprüfung der Myc und MycVD-Konstrukte

Im Westernblot (siehe Abbildung 3.1-14a) konnte die Überexpression von Myc und MycVD zwar gezeigt werden, allerdings ließ sich mit einem Antikörper gegen Myc nicht erkennen, ob es sich um Myc oder die Mutante MycVD handelte. Deswegen wurde ein Restriktionsverdau der für Myc kodierenden DNA-Sequenz vorgenommen, um die Punktmutation der Myc-Mutante nachzuweisen. Dazu wurde mittels PCR eine kurze Sequenz des humanen Myc- bzw MycVD-Plasmids, welche die Stelle der Punktmutation enthält, amplifiziert. Für den Verdau wurden die Enzyme Cla-I und EcoR-V eingesetzt. Cla-I erkennt eine Schnittstelle, die nur in der humanen Myc-Sequenz vorkommt. Dadurch konnte bewiesen werden, dass es sich bei der amplifizierten Sequenz nicht um endogenes Myc handelt. Durch die Punktmutation des MycVD-Plasmids entsteht im Vergleich zum normalen Myc-Plasmid eine neue Schnittstelle, die durch das Restriktionsenzym EcoR-V erkannt wird.

Die Sequenz, die durch die Primer amplifiziert wurde, war 698 bp groß und wurde sowohl in der Myc- als auch in der MycVD-Probe durch Inkubation des Amplikons ohne Enzyme kontrolliert (siehe Abbildung 3.1-16: die beiden rechten Banden). Für beide Konstrukte konnte gezeigt werden, dass es sich um humane Myc-Sequenzen handelte, da durch die Inkubation mit Cla-I die erwarteten Fragmente entstanden (siehe Abbildung 3.1-16: die beiden linken Banden).

Durch den Verdau mit EcoR-V wurde die Punktmutation nachgewiesen. In der Mutante MycVD war die zusätzliche Schnittstelle vorhanden, wodurch im Unterschied zum Verdau der normalen Myc-Sequenz (nur ein Fragment, 698bp), zwei kleinere Fragmente (601 und 100bp) gebildet wurden (siehe Abbildung 3.1-16: die beiden mittleren Banden).

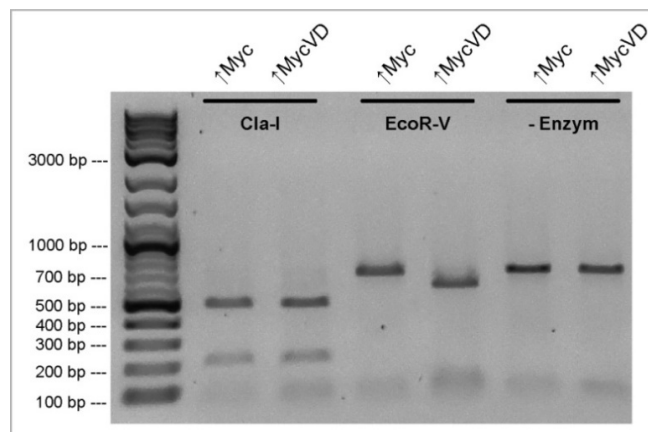


Abbildung 3.1-16: Kontrolle des Myc- und MycVD-Plasmids. HC11-Zellen wurden mit dem Myc- und dem MycVD-Konstrukt retroviral infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde RNA gewonnen, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Eine kurze Sequenz des humanen Myc-Gens wurde amplifiziert und danach durch Restriktionsenzyme verdaut. Die dabei entstandenen DNA-Fragmente wurden dann in einem 1%-Agarosegel aufgetrennt.

3.1.5.4 Induktion der Autophagie durch EBSS

Nach erfolgreicher Infektion der Zellen, sollte nun im Folgenden untersucht werden, ob sich Unterschiede in der Bildung von LC3-Punkten nach Autophagie-Induktion durch EBSS ergeben. Dafür wurden die mit den verschiedenen Konstrukten infizierten Zellen in drei unabhängigen Experimenten in LabTek®s ausgesät und für sechs Stunden, jeweils mit und ohne Zugabe von Inhibitoren, mit EBSS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen LC3 und einem Fluoreszenz-markiertem Sekundäntikörper angefärbt. Durch Auszählung der LC3-Punkte in den Zellen sollte die autophagische Aktivität der verschiedenen Zelllinien analysiert werden. In Abbildung 3.1-17 ist die autophagische Aktivität unbehandelter Zellen dargestellt. Da die Zellen nicht zur Autophagie stimuliert wurden, zeigten die Zellen ein weitgehend homogen grün gefärbtes Zytoplasma mit vereinzelt LC3-Punkten. Diese spiegelten die basale autophagische Aktivität der Zellen wieder. Morphologisch unterschieden sich auf den ersten Blick nur die Myc-Zellen von den Übrigen (Abb. 3.1-17c). Sie fielen durch einen vergleichsweise großen Zellkern und ein verbreitertes Zytoplasma, sowie seitliche Ausläufer, auf. Um die autophagische Aktivität dieser Zellen zu quantifizieren, wurden für jede Kondition die LC3-Punkte pro Zelle in insgesamt 100 Zellen je Experiment ausgezählt.

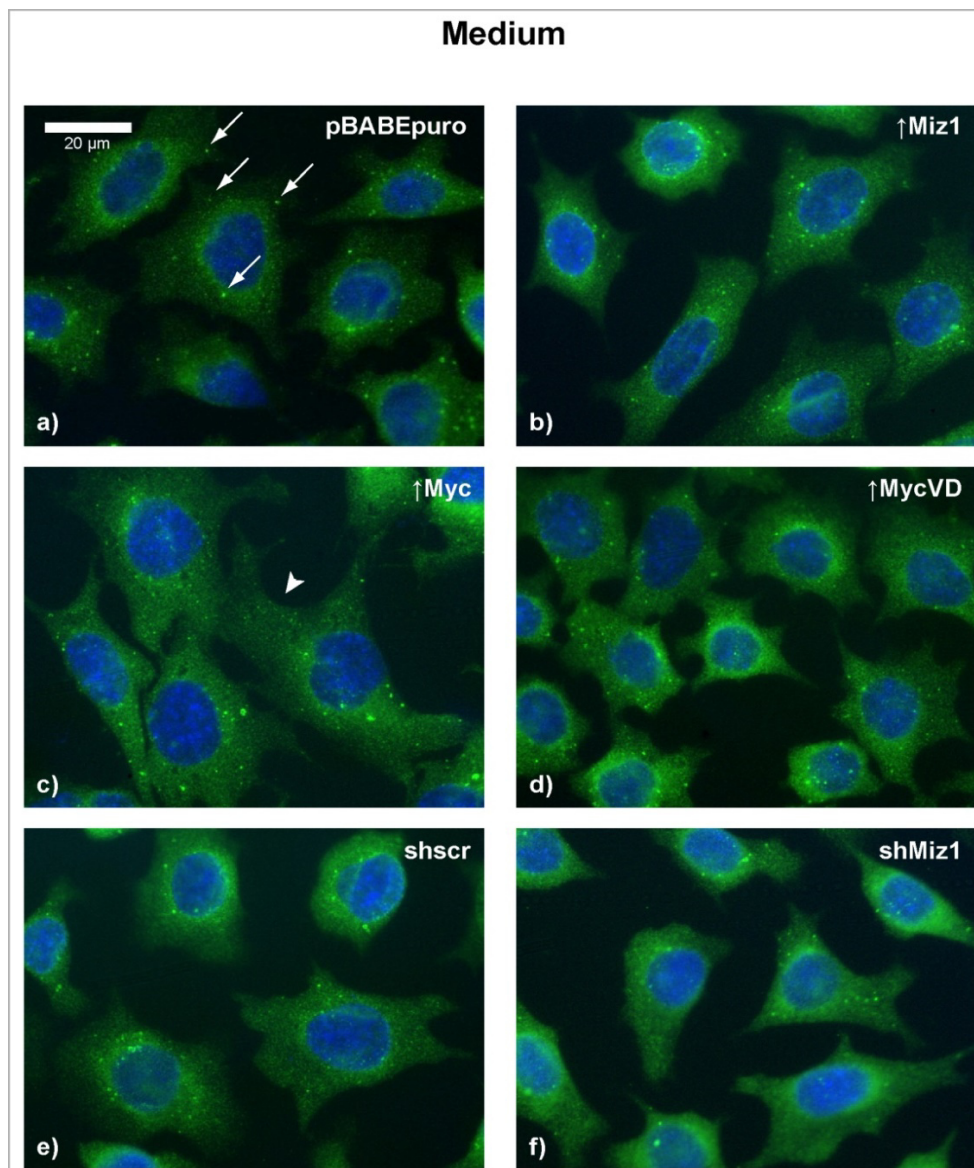


Abbildung 3.1-17: Darstellung der autophagischen Aktivität in Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in Vollmedium. HC11-Zellen, die mit den dargestellten Konstrukten stabil infiziert waren, wurden in Lab-Tek®s für 6 h in normalem Medium ohne lysosomale Inhibitoren inkubiert (a-f). Die LC3-Färbung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blau). Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft auf LC3-Punkte. Die Pfeilspitze zeigt beispielhaft auf eine Myc-Zelle mit vergleichsweise großem Zellkern, verbreitertem Zytoplasma und Ausläufern (c).

In der Auszählung der LC3-Punkte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Zellen (siehe Abbildung 3.1-18). Die meiste autophagische Grundaktivität zeigten Zellen, die mit dem Myc-Konstrukt infiziert waren. In Zellen die MycVD überexprimierten, waren hingegen genauso viele LC3-Punkte zu finden, wie in Kontrollzellen (pBABEpuro). Auch Zellen die Miz1 überexprimierten zeigten eine leicht erhöhte basale autophagische Aktivität. Zwischen Zellen in

denen Miz1 durch sh-RNA herunterreguliert war und den entsprechenden Kontrollzellen (ShScr) zeigten sich keine Unterschiede.

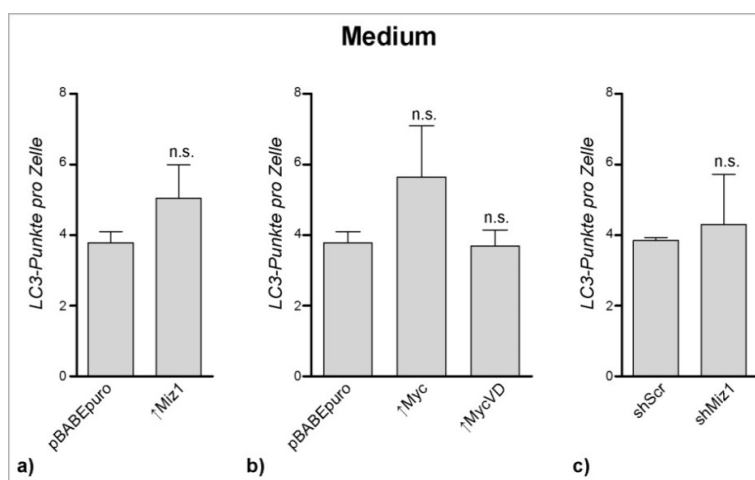


Abbildung 3.1-18: Quantifizierung der autophagischen Aktivität von Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in Vollmedium. In drei unabhängigen Experimenten wurden die in Abbildung 3.1-17 gezeigten LC3-Punkte in je 100 Zellen pro Kondition ausgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden beim Vergleich zweier Bedingungen (a + c), mittels Studentent-T-Test und beim Vergleich von mehr als zwei Bedingungen (b) mittels einfaktorier ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich der Einsatz lysosomaler Inhibitoren auf die Anzahl von LC3-Punkten bei sechsständiger Inkubation in Vollmedium auswirkt (siehe Abb. 3.1-19). Da auch hier keine Autophagie induziert wurde, fand sich ebenfalls ein weitgehend homogen grünes Zytoplasma mit vereinzelt LC3-Punkten. Auch hier fielen die langen Ausläufer der Myc-Zellen auf (Abb. 3.1-19c).

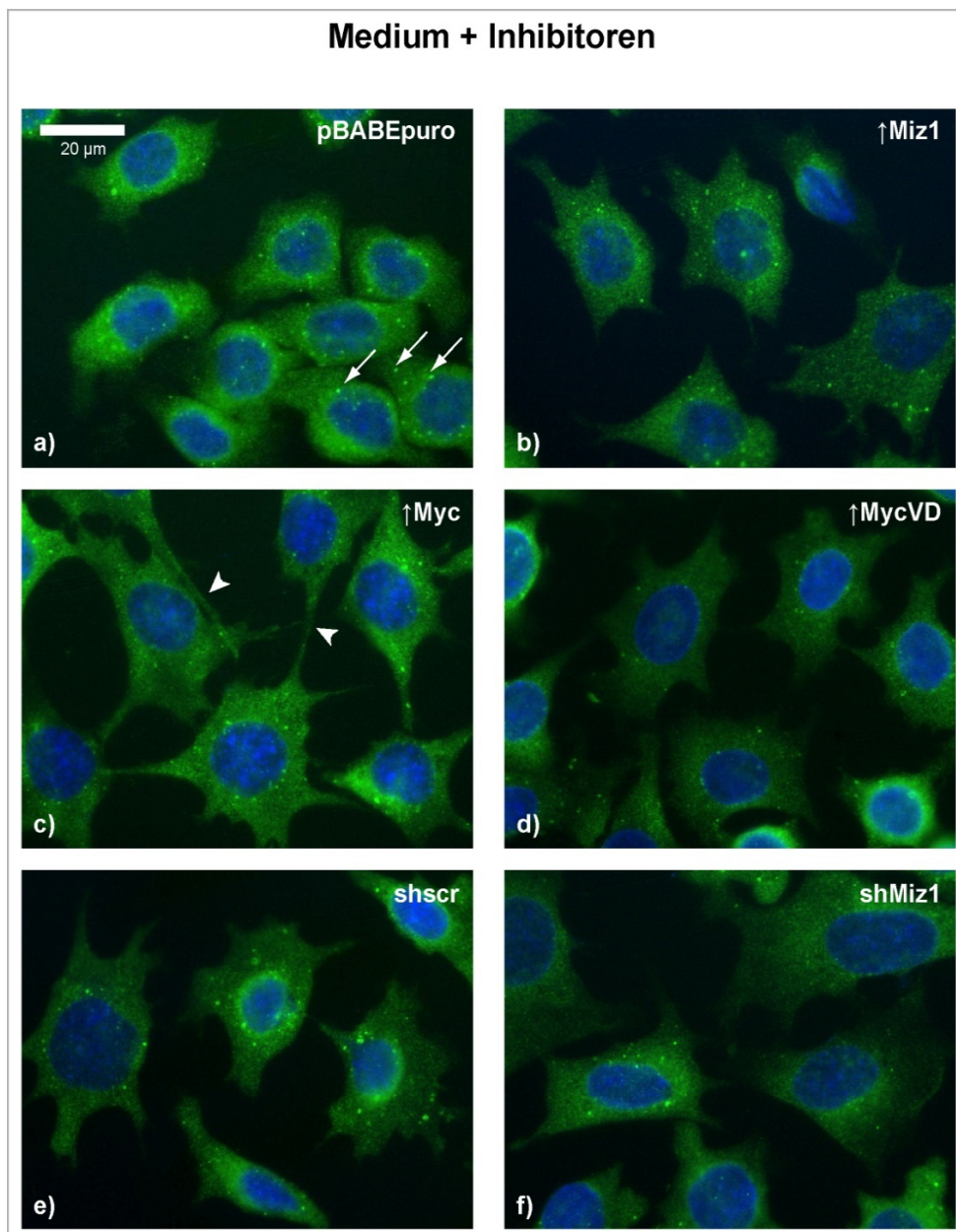


Abbildung 3.1-19: Darstellung der autophagischen Aktivität in Zellen, die mit den Miz-1, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in Vollmedium mit Inhibitoren. HC11-Zellen, die mit den dargestellten Konstrukten stabil infiziert waren, wurden in Lab-Tek®s für 6 h in normalem Medium mit lysosomalen Inhibitoren (E-64d und Pepstatin A, je 10 µg/ml) inkubiert (a – f). Die LC3-Färbung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blau). Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft auf LC3-Punkte. Die Pfeilspitzen zeigen beispielhaft auf Myc-Zellen mit vergleichsweise großem Zellekern, verbreitertem Zytoplasma und Ausläufern (c).

In der Auszählung der LC3-Punkte zeigten sich die gleichen Tendenzen wie in Zellen die nur mit Medium behandelt wurden. Auch hier fielen Zellen, die Myc überexprimierten und in geringerem Ausmaß auch Zellen, die Miz1 überexprimierten, durch eine verstärkte autophagische Aktivität im

Vergleich zu den übrigen Zelltypen auf. Die Inhibitoren zeigten unter diesen normalen Wachstumsbedingungen aber nur wenig Wirkung. Im Vergleich zu Zellen, in denen der lysosomale Abbau nicht gehemmt wurde, fand sich in den mit Inhibitoren behandelten Zellen durchschnittlich etwa ein Punkt mehr pro Zelle.

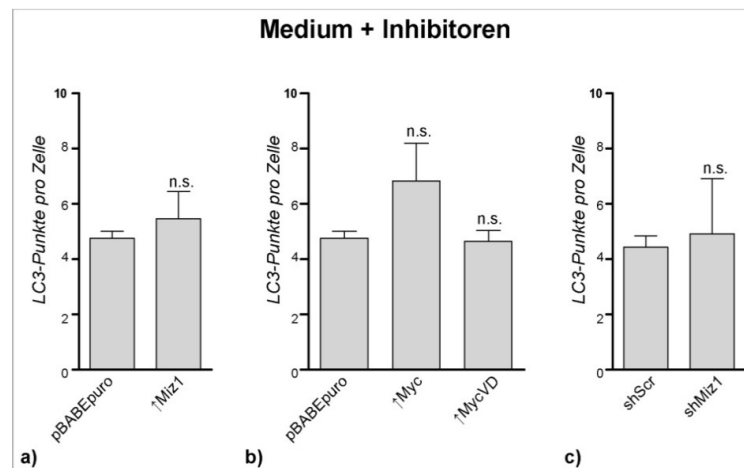


Abbildung 3.1-20: Quantifizierung der autophagischen Aktivität von Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in Vollmedium mit Inhibitoren. In drei unabhängigen Experimenten wurden die in Abbildung 3.1-19 gezeigten LC3-Punkte in je 100 Zellen ausgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden beim Vergleich zweier Bedingungen (a + c), mittels Studenten-T-Test und beim Vergleich von mehr als zwei Bedingungen (b) mittels einfaktorier ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt.

In Zellen, in denen mit EBSS Autophagie stimuliert wurde, ließ sich unabhängig vom exprimierten Konstrukt, eine Zunahme der LC3-Punkte im Vergleich zu Zellen, die in normalem Nährmedium wuchsen (siehe Abbildung 3.1-17, 3.1-18 und 3.1-21, 3.1-22), beobachten. Morphologisch fielen auch hier wieder die Zellen, die Myc überexprimierten, auf. Zum einen durch ihre wie bereits beschriebenen großen Zellkerne, das breite Zytoplasma und die Ausläufer, zum anderen schienen die LC3-Punkte zahlreicher, aber dafür kleiner als in allen anderen Zelltypen. Zellen, die MycVD überexprimierten, unterschieden sich morphologisch nicht von Kontrollzellen.

In der Auszählung der LC3-Punkte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Zellen die Myc und denen die MycVD überexprimierten, sowie den Kontrollzellen (siehe Abbildung 3.1-22 b). In den Myc Zellen fanden sich durchschnittlich 10,65 Punkte pro Zelle, in den MycVD und den pBABEpuro-Zellen hingegen nur etwa 7 Punkte pro Zelle. Das weist darauf hin, dass die Interaktion von Myc und Miz1 unter nährstoffarmen Bedingungen für den autophagischen Prozess wichtig sein könnte. Zellen, die Miz1 überexprimierten, hatten tendenziell etwas mehr LC3-Punkte, der Unterschied war im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle aber nicht signifikant. Zwischen Zellen in denen Miz1 supprimiert war und den entsprechenden Kontrollzellen fanden sich keine Unterschiede. Dieses

Ergebnis könnte allerdings auch auf den schwachen Miz 1-Knockdown zurückzuführen sein (siehe Abbildung 3.1-21 und 3.1-22).

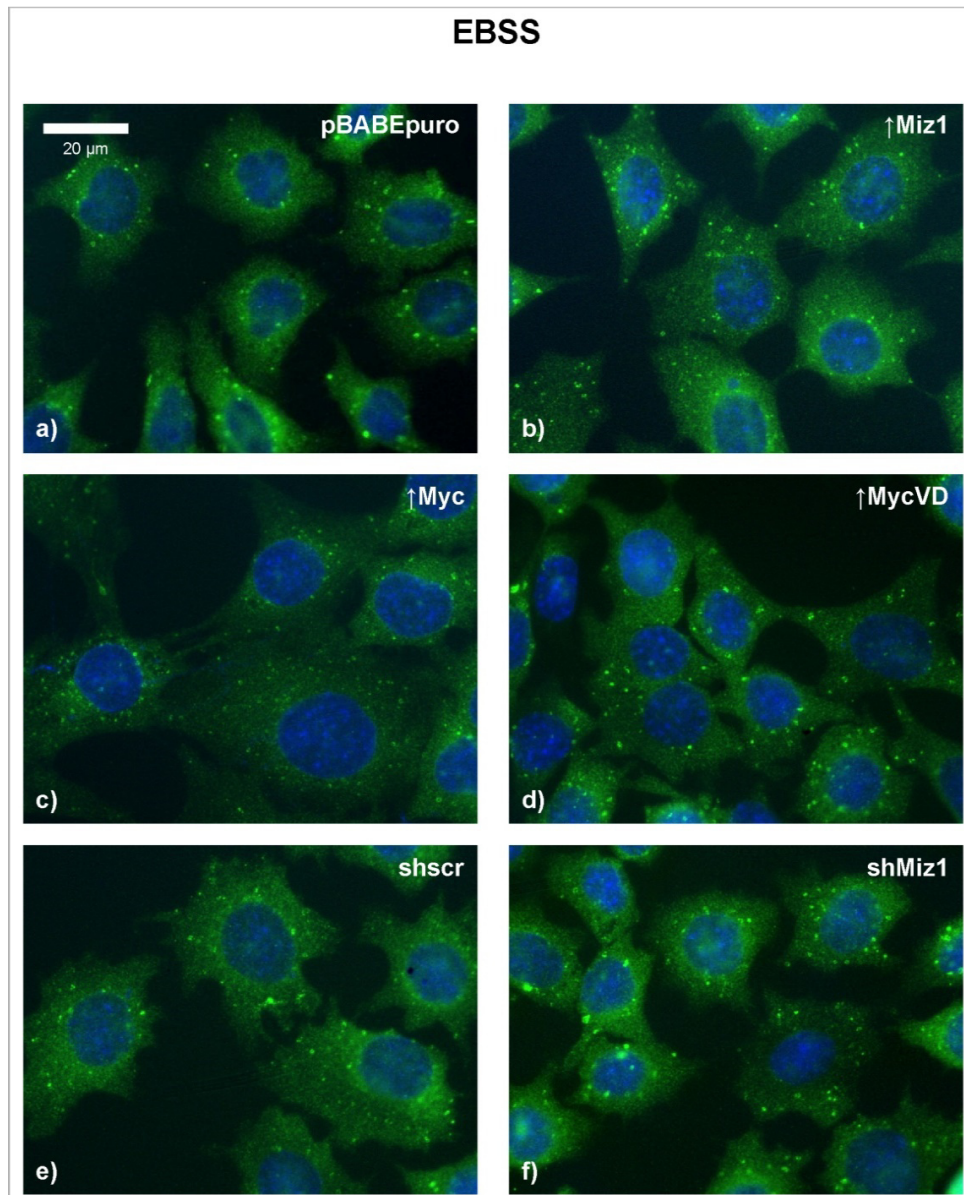


Abbildung 3.1-21: Darstellung der autophagischen Aktivität in Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in EBSS. HC11-Zellen, die mit den dargestellten Konstrukten stabil infiziert waren, wurden in Lab-Tek®s für 6h in EBSS ohne lysosomale Inhibitoren inkubiert (a – f). Die LC3-Färbung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blau).

Um den Effekt des EBSS durch eine Unterbrechung des autophagischen Flusses zu verstärken, wurden in einer weiteren Bedingung dem EBSS noch lysosomale Inhibitoren hinzugefügt. Auch in dieser Bedingung ließ sich in allen verschiedenen Zelltypen Autophagie stimulieren und sie zeigten mehr LC3-

Punkte als Zellen, die in Medium (mit oder ohne Inhibitoren) gewachsen waren (vergleiche Abb. 3.1-23 mit Abb. 3.1-17 und Abb. 3.1-19).

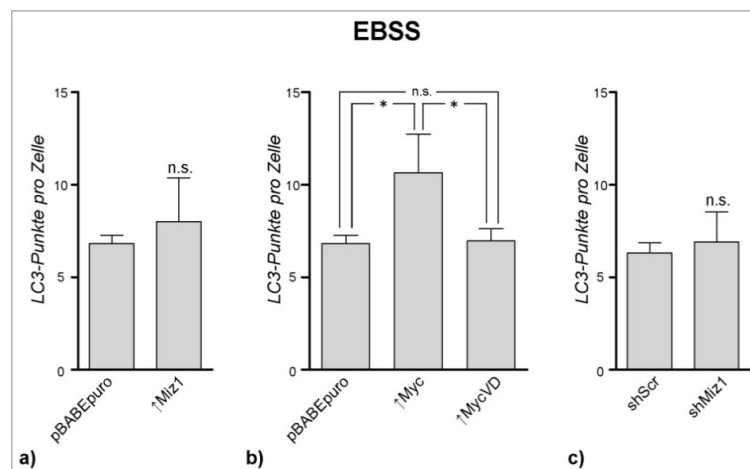


Abbildung 3.1-22: Quantifizierung der autophagischen Aktivität von Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in EBSS. In drei unabhängigen Experimenten wurden die in Abbildung 3.3-21 gezeigten LC3-Punkte in je 100 Zellen ausgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden beim Vergleich zweier Bedingungen (a + c), mittels Studentent-T-Test und beim Vergleich von mehr als zwei Bedingungen (b) mittels einfaktorier ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

Die Myc-Zellen unterschieden sich durch die Zugabe der Inhibitoren noch deutlicher von den anderen Zellen, da hier die LC3-Punkte sehr zahlreich und vergleichsweise klein vorhanden waren (siehe Abb. 3.1-23 c). Große Zellkerne und Zytoplasma-Ausläufer ließen sich auch hier finden. Die MycVD-Zellen glichen auch hier eher den Kontrollzellen, als denen, die Myc überexprimierten (siehe Abb. 3.1-23 d). Durch die Zugabe der lysosomalen Inhibitoren wurden die Unterschiede in der Quantifizierung der autophagischen Aktivität noch etwas deutlicher (siehe Abb. 3.1-24). Zellen, die Myc überexprimierten, zeigten im Durchschnitt 16,22 Punkte und unterschieden sich somit signifikant von MycVD-Zellen mit 9,24 und Kontrollzellen mit durchschnittlich 7,73 Punkte pro Zelle (siehe Abb. 3.1-24 b). Der Unterschied zwischen MycVD und der Kontrolle war nicht signifikant. Diese Beobachtung unterstreicht die Annahme, dass die Interaktion von Miz1 und Myc für Autophagie eine Rolle spielen könnte. Ob diese Interaktion allerdings essentiell für den autophagischen Prozess ist, lässt sich aus diesen Experimenten nicht ableiten, da die Zellen, die MycVD überexprimierten, auch noch endogenes Myc produzierten, das durchaus an Miz1 binden kann. Auch der leichte Unterschied zwischen Zellen die Miz1 überexprimierten (8,81 Punkte pro Zelle, siehe Abb. 3.1-24 a) und den entsprechenden Kontrollzellen, der sich in den vorherigen Bedingungen bereits angedeutet hatte, hat sich durch die Zugabe der Inhibitoren verstärkt und wurde statistisch signifikant. Zwischen den Miz1-

Knockdown-Zellen und der Kontrolle ergaben sich wiederum keine Unterschiede (siehe Abbildung 3.1-24 c).

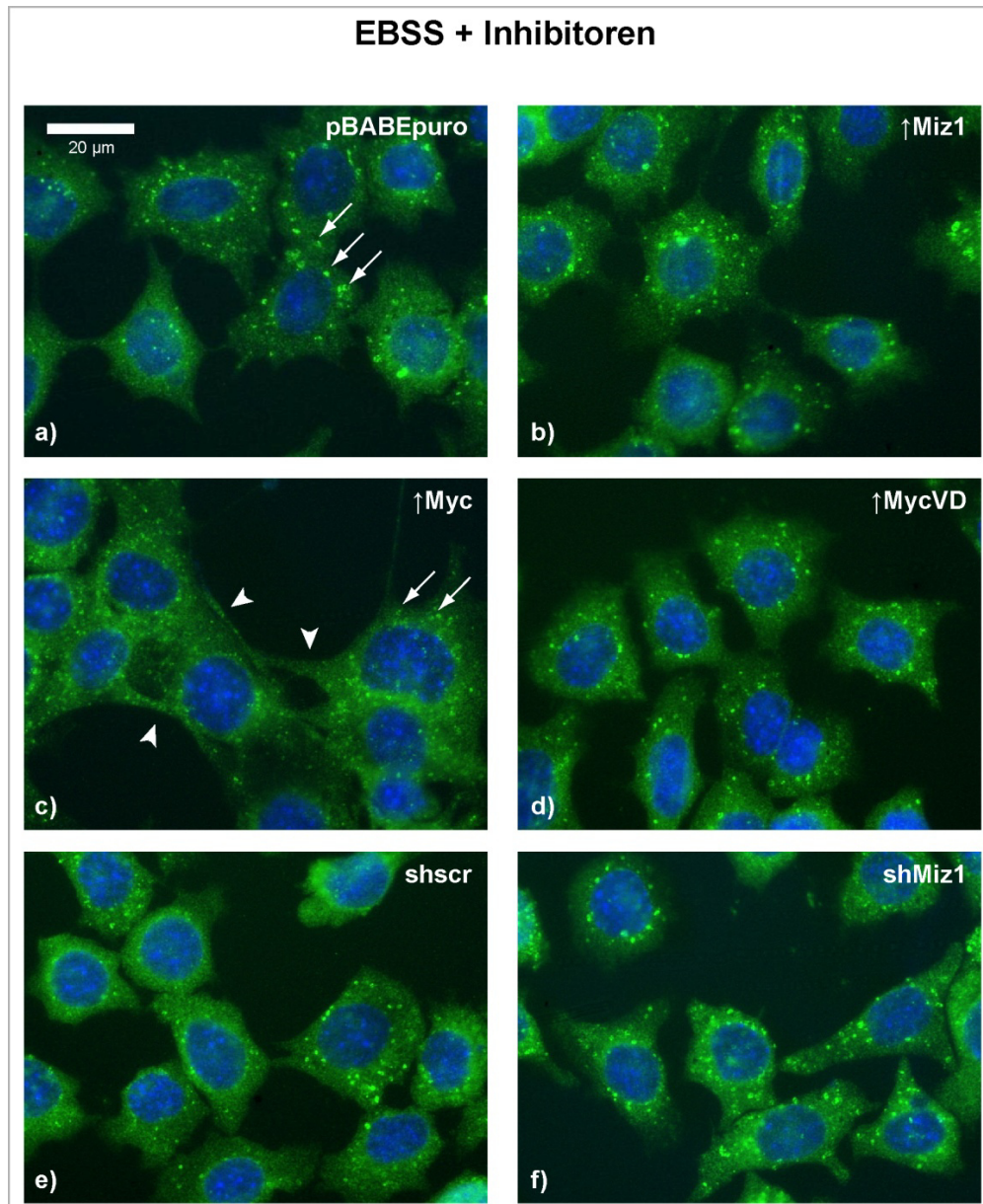


Abbildung 3.1-23: Darstellung der autophagischen Aktivität in Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in EBSS mit Inhibitoren. HC11-Zellen, die mit den dargestellten Konstrukten stabil infiziert waren, wurden in Lab-Tek®s für 6h in EBSS mit lysosomalen Inhibitoren (E-64d und Pepstatin A, je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert (a – f). Die LC3-Färbung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blau). Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft auf LC3-Punkte. Die Pfeilspitzen zeigen beispielhaft auf Myc-Zellen mit vergleichsweise großem Zellekern, verbreitertem Zytoplasma und Ausläufern (c).

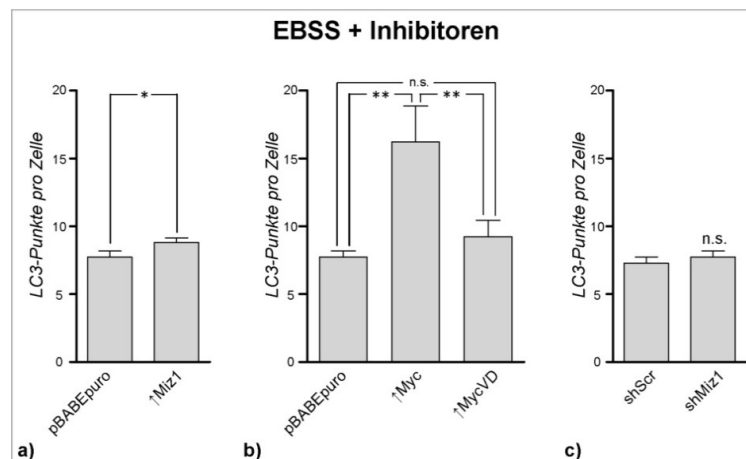


Abbildung 3.1-24: Quantifizierung der autophagischen Aktivität von Zellen, die mit den Miz1-, shMiz1-, Myc-, MycVD-, shScr- und pBABEpuro-Konstrukten infiziert wurden, nach Inkubation in EBSS mit Inhibitoren. In drei unabhängigen Experimenten wurden die in Abbildung 3.1-23 gezeigten LC3-Punkte in je 100 Zellen ausgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden beim Vergleich zweier Bedingungen (a + c), mittels Studenten-T-Test und beim Vergleich von mehr als zwei Bedingungen (b) mittels einfaktorier ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

3.1.6 Elektronenmikroskopische Analyse von Myc bzw. MycVD überexprimierenden Zellen nach Induktion von Autophagie

Um die bezüglich ihrer autophagischen Aktivität in Abschnitt 3.1.5 festgestellten Unterschiede zwischen Zellen, die Myc bzw. MycVD überexprimierten, zu überprüfen und morphologisch genauer beurteilen zu können, wurden elektronenmikroskopische Bilder dieser Zellen angefertigt. Hierfür wurden die Zellen in einem Experiment, genau wie für die fluoreszenzmikroskopische Analyse in Abschnitt 3.1.5, für sechs Stunden in EBSS sowohl mit, als auch ohne Inhibitoren stimuliert. Zum Vergleich wurden weitere Zellproben für die gleiche Zeit in Nährmedium (ebenfalls mit und ohne Inhibitoren) inkubiert. Anschließend wurden diese, wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, für die Elektronenmikroskopie eingebettet und im Vergleich ausgewertet. Es wurde untersucht, ob Zellen, die Myc bzw. MycVD überexprimierten, morphologische Unterschiede vor allem bezüglich der Autophagosomen aufweisen. Für die verschiedenen Reifestadien der Autophagosomen wird im Folgenden zusammenfassend der Begriff autophagische Vakuole (AV) verwendet.

Sowohl in Myc-, als auch in MycVD-Zellen, zeigten sich bei Inkubation in normalem Nährmedium vereinzelte autophagische Vakuolen, die auf die basale autophagische Aktivität der Zellen zurückzuführen sind (siehe Abb. 3.1-25 a-b und Abb. 3.1-26 a-c).

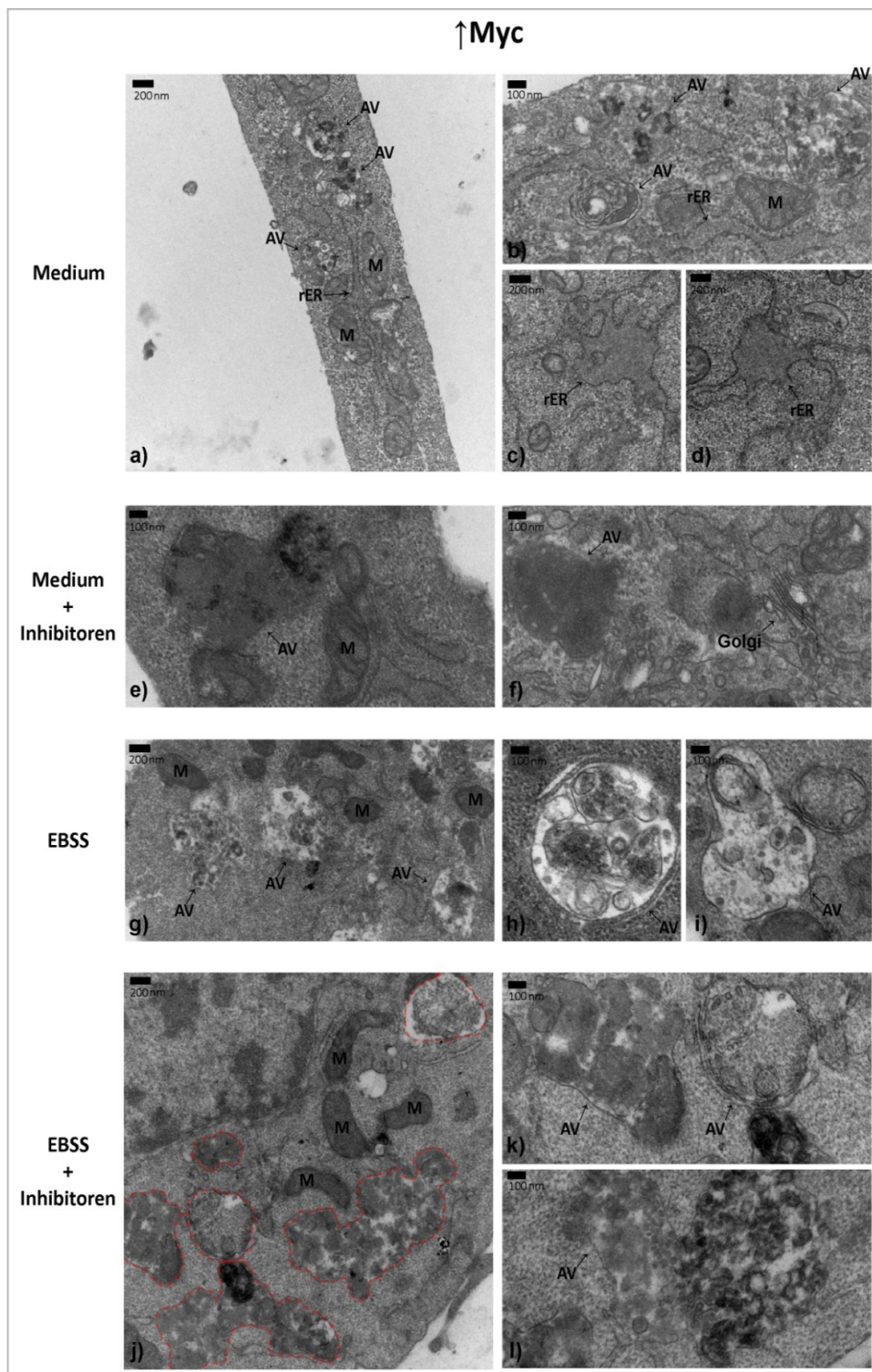


Abbildung 3.1-25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die Myc überexprimieren. HC11-Zellen, die ein Myc-Konstrukt stabil überexprimierten, wurden für 6h in normalem Nährmedium bzw. EBSS sowohl mit, als auch ohne lysosomale Inhibitoren inkubiert und anschließend für elektronenmikroskopische Analysen aufbereitet. Vor allem in der Bedingung EBSS mit Inhibitoren zeigten diese Zellen zahlreiche und vergrößerte autophagische Vakuolen (rote Markierung in j). AV = Autophagische Vakuole, M = Mitochondrium, rER = raues endoplasmatisches Retikulum, N = Nukleus.

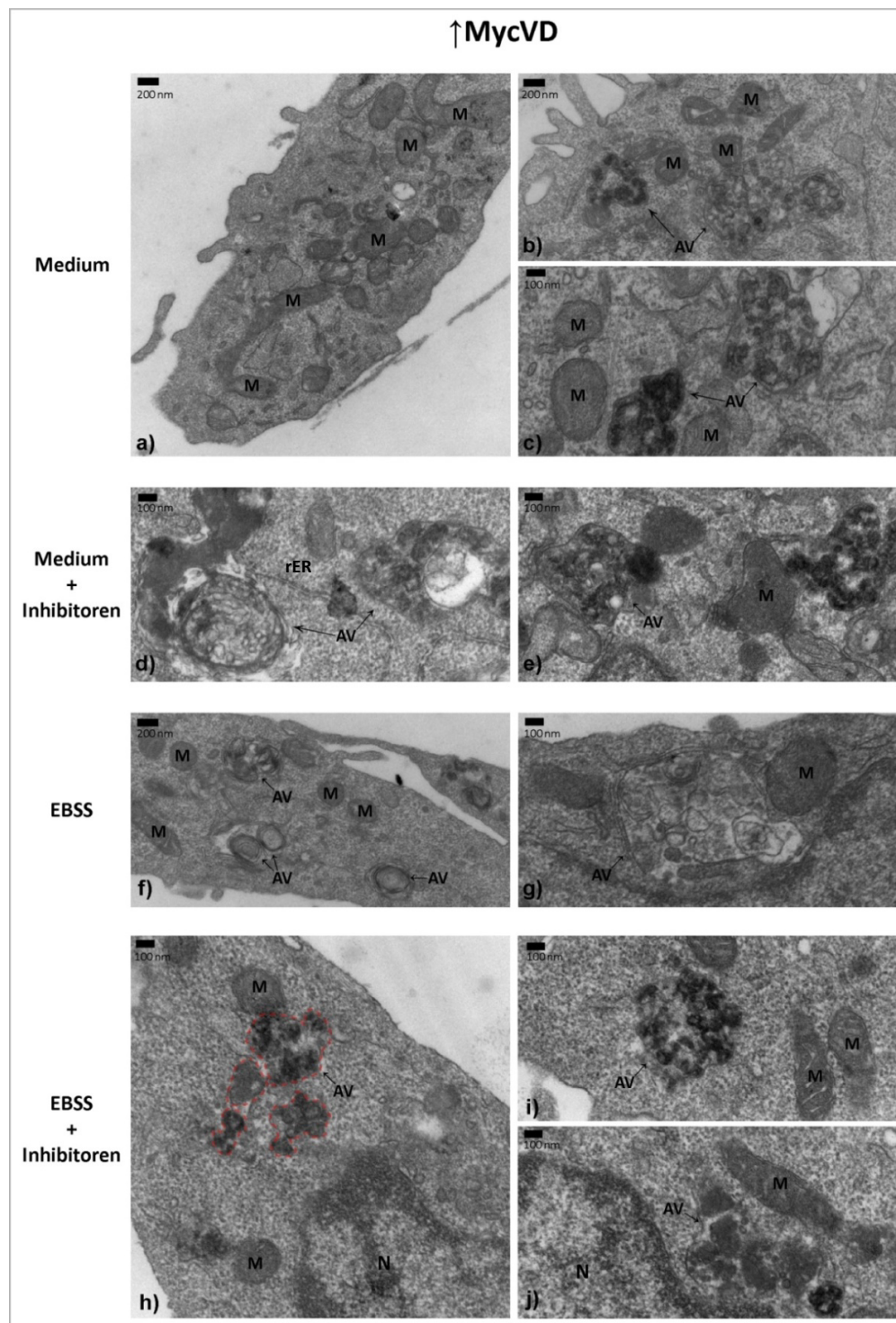


Abbildung 3.1-26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die MycVD überexprimieren. HC11-Zellen, die das MycVD-Konstrukt stabil überexprimierten, wurden für 6 h in normalem Nährmedium bzw. EBSS sowohl mit, als auch ohne lysosomale Inhibitoren inkubiert und anschließend für elektronenmikroskopische Analysen aufbereitet. In der Bedingung EBSS mit Inhibitoren zeigten diese Zellen deutlich weniger und kleinere autophagische Vakuolen (rote Markierung in **h**) als Zellen, die das Myc-Konstrukt überexprimierten (Abb. 3.1-25 j). AV = Autophagische Vakuole, M = Mitochondrium, rER = raues endoplasmatisches Retikulum, N = Nukleus.

Da nur relativ wenige und stark vergrößerte Bildausschnitte vorlagen, war eine quantitative Analyse der AVs leider nicht möglich. Auch Unterschiede zwischen Konditionen mit (siehe Abb. 3.1-25 e-f und Abb. 3.1-26 d-e) und ohne lysosomale Inhibitoren (siehe Abb. 3.1-25 a-b und Abb. 3.1-26 a-c) waren deswegen schwierig herauszuarbeiten. Da es sich bei der Autophagie (wie in Abschnitt 2.2.4.1 bereits erklärt) um einen fließenden Prozess handelt, konnten in allen Konditionen AVs in verschiedenen Reifestadien gefunden werden. Frühe, unreife Autophagosomen waren daran zu erkennen, dass noch unverdautes Zytoplasmamaterial von einer Doppelmembran eingeschlossen war ((Mizushima et al., 2010a) Abbildung 3.1-25 h, k (rechts) und Abbildung 3.1-26 g). Abbildung 3.1-25 l zeigt ein Autophagosom, das gerade mit einem Lysosom verschmilzt. Späte AVs zeichneten sich durch eine einschichtige Membran, sowie einen homogeneren Inhalt im Unterschied zu den frühen AVs aus, da hier die Degradation bereits begonnen hatte (Abbildung 3.1-25 j, k (links), l und Abbildung 3.1-26 c, h, i, j).

Auffällig war, dass Zellen, die Myc überexprimierten, vermehrt aufgetriebenes und vergrößertes raues endoplasmatisches Retikulum (rER) aufwiesen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass diese Zellen vermehrt Proteine produzieren (Abbildung 3.1-25 c und d). Im Kontrast dazu zeigten MycVD-Zellen ein normal großes rER (Abbildung 3.1-26 d).

Zusammenfassend kann man sagen: auch auf elektronenmikroskopischer Ebene zeigten sich Unterschiede bezüglich der autophagischen Aktivität in Myc- bzw. MycVD-Zellen, die für sechs Stunden mit EBSS behandelt waren. Vor allem in den Konditionen, in denen der autophagische Fluss durch den Einsatz von Inhibitoren unterbrochen worden war, konnten in Zellen, die Myc überexprimierten, deutlich mehr AVs gefunden werden, als in Zellen, die MycVD überexprimierten (Vergleiche Abbildung 3.1-25 j und Abbildung 3.1-26 h, AVs wurden rot markiert). Außerdem waren die AVs in Myc-Zellen größer, als in MycVD-Zellen. Diese Beobachtungen im Zusammenhang mit den fluoreszenzmikroskopischen Analysen erhärten den Verdacht, dass die Interaktion zwischen Miz1 und Myc für den Ablauf der Autophagie wichtig ist.

3.1.7 Genexpressionsanalysen von Myc bzw. MycVD überexprimierenden Zellen nach Induktion von Autophagie

Um für die Unterschiede, die zwischen Zellen, die das Myc-Konstrukt und Zellen, die das MycVD-Konstrukt überexprimierten, eine Erklärung zu finden, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die entsprechend infizierten Zellen in drei unabhängigen Experimenten für sechs Stunden in Medium bzw. EBSS inkubiert. Auf den Einsatz lysosomaler Inhibitoren wurde hier verzichtet. Um den Einfluss der Überexpression von Myc auf Autophagie ebenfalls beurteilen zu

können, wurden in zwei Experimenten mit dem ShScr-Konstrukt infizierte Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, RNA daraus isoliert und cDNA hergestellt, welche mittels qRT-PCR analysiert werden konnte. Zur Messung der Genexpression wurden einige Gene ausgewählt, die in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe (Oppenheimer, 2009 und Berliner, 2012), sowie in der Literatur (Wolf et al., 2013) als durch Miz1 beeinflusst beschrieben wurden.

3.1.7.1 Vergleich der Expression Autophagie-assoziiierter Gene

Bei früheren Experimenten, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden, konnten *Atg4c*, *Atg5*, *Atg7* und *Atg9b* als von Miz1 abhängige Gene identifiziert werden (Oppenheimer, 2009). Hier sollte nun untersucht werden, ob die Regulierung dieser Gene durch Miz1 alleine, oder im Zusammenspiel mit Myc erfolgt. Die in dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse der Expression von *Atg7* und *Atg9b* mussten allerdings aufgrund technischer Schwierigkeiten leider von der Auswertung ausgeschlossen werden. Weiterhin sollten die Untersuchungen auf die Gene *Atg3*, *Atg4a* und *Atg12* ausgedehnt werden. In Abbildung 3.1-27 wurde die Genexpression in Zellen, die MycVD, sowie ShScr überexprimierten, mit der Genexpression von Zellen, die Myc überexprimierten verglichen. Die Höhe der Genexpression von Myc-Zellen, die mit Medium behandelt wurden, wurde hierfür mit 1 gleichgesetzt und die ermittelten Expressionen in allen anderen Bedingungen als die n-fache Expression dieses Gens dargestellt.

Die Expression von *Atg4a* und *Atg4c* zeigte sich unter normalen Wachstumsbedingungen sowohl durch die Überexpression von Myc (durchschnittliche relative Genexpression (rG): 1), als auch von MycVD (rG: *Atg4a*: 1.05, *Atg4c*: 0.9) leicht erhöht im Vergleich zu den ShScr-Kontrollzellen (rG: *Atg4a*: 0.85, *Atg4c*: 0,76; siehe Abb. 3.1-27 b und c). Die übrigen untersuchten Gene waren in allen drei Zelltypen bei Inkubation in normalem Nährmedium in etwa gleichstark exprimiert (siehe Abb. 3.1-27 a, d, e). Zwischen Zellen, die Myc bzw. MycVD überexprimierten, waren keine Unterschiede bezüglich der Expression der gemessenen Gene erkennbar. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Expression von *Atg4a* und *Atg4c* durch die Überexpression von Myc leicht induziert wird, die Höhe der Expression aber in keinem der getesteten Gene von der Interaktion zwischen Miz1 und Myc abhängt.

Wie in Abbildung 3.1-27 erkennbar, sind nicht alle der hier getesteten Autophagie-assoziierten Gene durch EBSS induzierbar. In den mit dem Kontrollvektor infizierten Zellen ließ sich die Expression von *Atg4a* und *Atg5* durch Inkubation in EBSS leicht (Mittelwerte der beiden Messungen: *Atg4a*: 1,54; *Atg5*: 1,59) und von *Atg12* relativ stark (Mittelwert beider Messungen: 5.73) induzieren (siehe Abb.

3.1-27 b, d, e). In Zellen, die die Myc-Mutante MycVD überexprimierten, ließ sich die Genexpression von *Atg 3*, *Atg 4a* und *Atg 5* durch EBSS leicht (in etwa auf das 1,5-fache) induzieren.

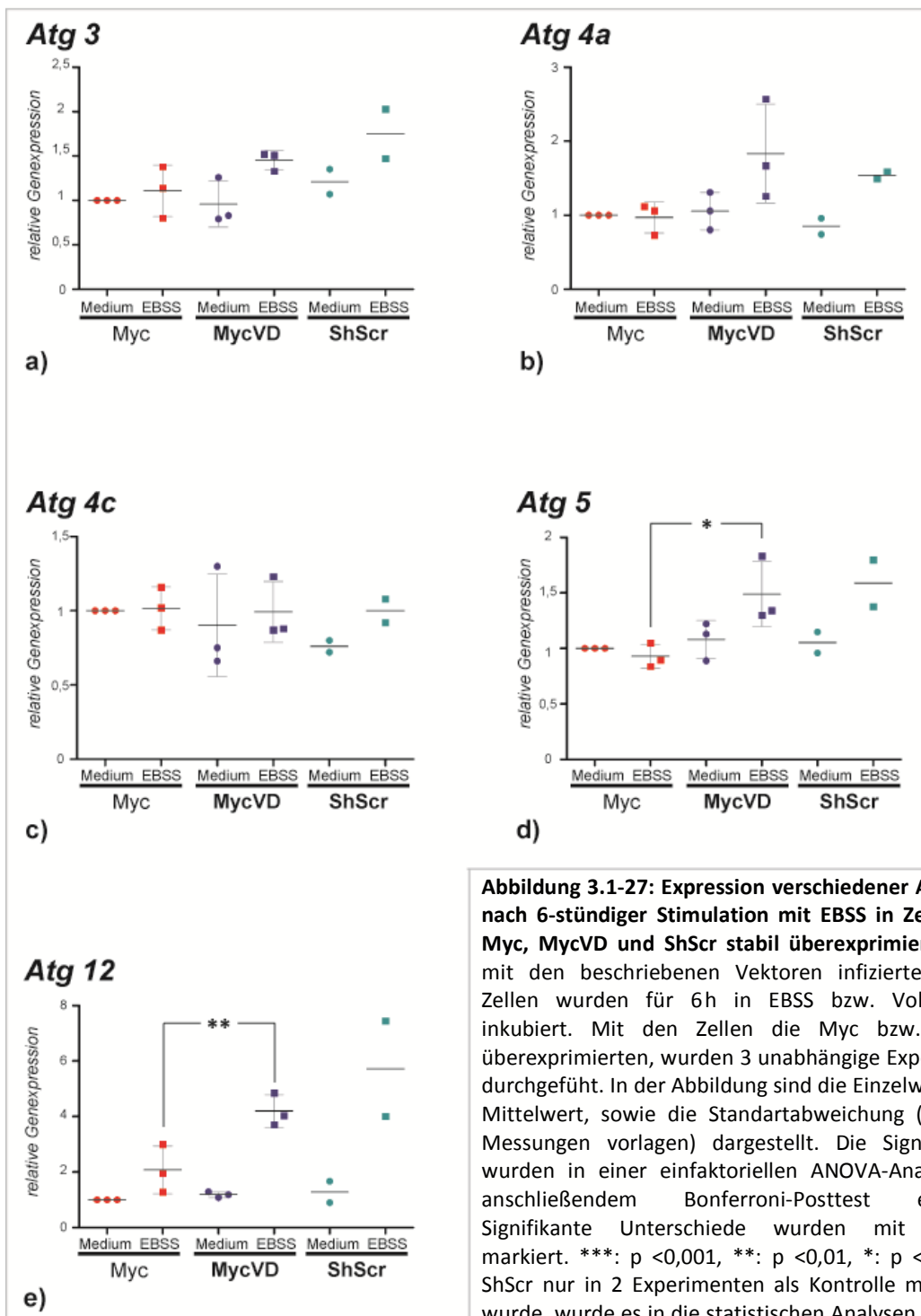


Abbildung 3.1-27: Expression verschiedener Atg-Gene nach 6-stündiger Stimulation mit EBSS in Zellen, die Myc, MycVD und ShScr stabil überexprimierten. Die mit den beschriebenen Vektoren infizierten HC11-Zellen wurden für 6 h in EBSS bzw. Vollmedium inkubiert. Mit den Zellen die Myc bzw. MycVD überexprimierten, wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. In der Abbildung sind die Einzelwerte, der Mittelwert, sowie die Standardabweichung (sofern 3 Messungen vorlagen) dargestellt. Die Signifikanzen wurden in einer einfaktorischen ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$. Da ShScr nur in 2 Experimenten als Kontrolle mitgeführt wurde, wurde es in die statistischen Analysen nicht mit einbezogen.

Die Expression von *Atg12* war in diesem Zelltyp unter Behandlung mit EBSS ebenfalls relativ stark (Mittelwert der drei Messungen: 4.19, p-Wert im Vergleich zur Medium-Kontrolle <0,001) erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Zellen, die in normalem Nährmedium gewachsen waren (siehe Abb. 3.1-27 b,d,e). In Zellen, die mit dem normalem Myc-Konstrukt infiziert waren, ließ sich außer bei *Atg12* (rG: 2,08; siehe Abb. 3.1-27) bei keinem der untersuchten Gene die Expression durch Nährstoffentzug induzieren. Durch die Behandlung mit EBSS verdoppelte sich die Expression von *Atg12* (p-Wert im Vergleich zur Medium-Kontrolle nicht signifikant; siehe Abb. 3.1-27 e).

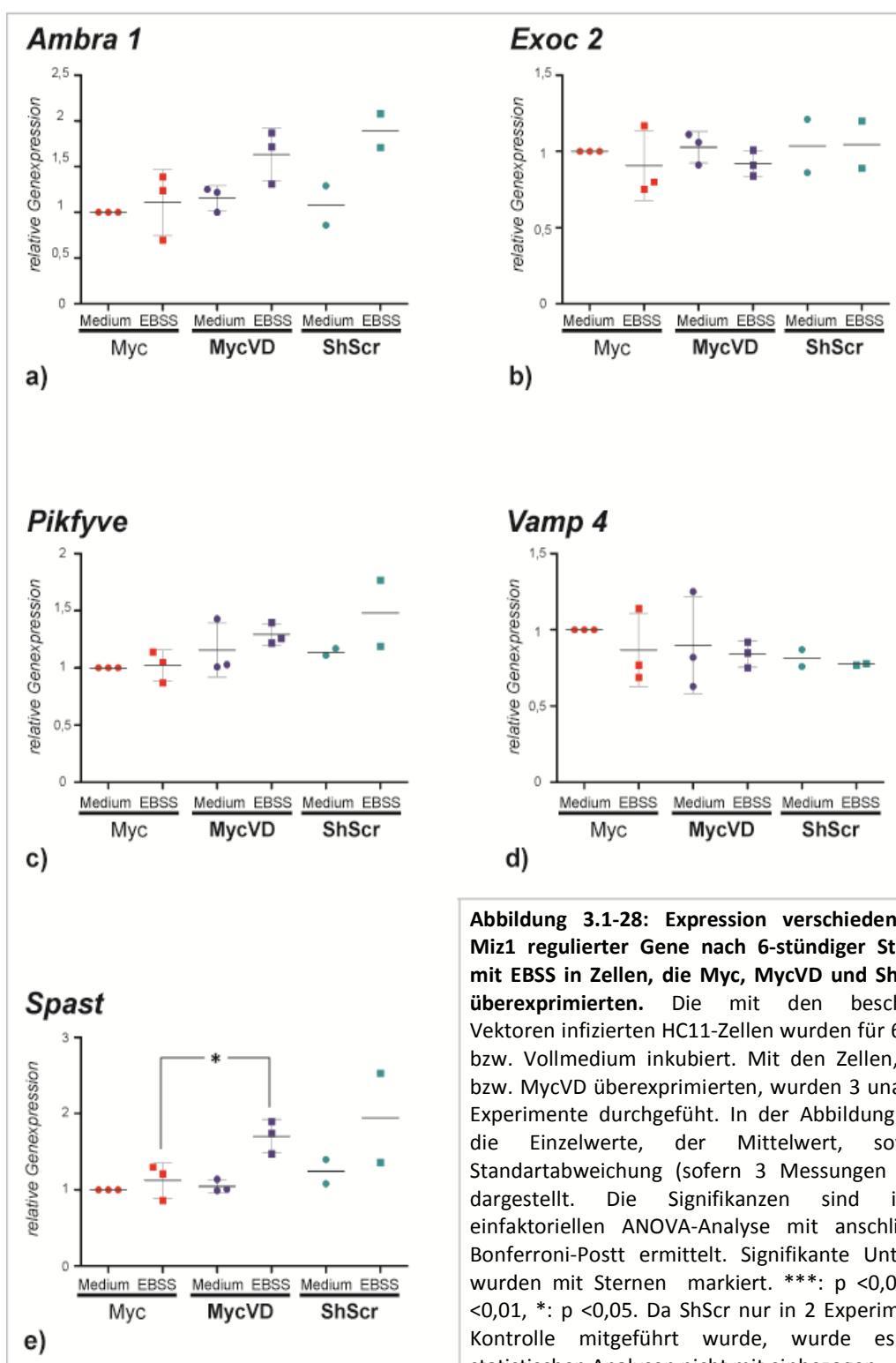
Im Hinblick auf die Induzierbarkeit der Genexpression unter nährstoffarmen Bedingungen zeigten sich sowohl bei *Atg5* (p-Wert < 0,05) als auch bei *Atg12* (p-Wert < 0,01) deutliche Unterschiede zwischen Zellen, die Myc- bzw. MycVD überexprimierten. In beiden Fällen war die Expression in den Zellen, die das MycVD-Konstrukt überexprimierten, höher (rG: *Atg5*: 1,49; *Atg12*: 4,19) als in Zellen, die Myc überexprimierten (rG: *Atg5*: 0.93; *Atg12*: 2.08). Auch für die Expression von *Atg3* und *Atg4a* zeigten sich ähnliche, jedoch statistisch nicht signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Interaktion zwischen Miz1 und Myc wahrscheinlich einen hemmenden Einfluss auf die Expression dieser Gene hat.

3.1.7.2 Vergleich der Expression von Genen, die durch Miz1 reguliert werden

Weiterhin sollte die Expression einiger Gene untersucht werden, die in einer kürzlich erschienenen Publikation als durch Miz1 reguliert beschrieben wurden (Wolf et al., 2013). Diese Gene sind ebenfalls für den autophagischen Prozess von Bedeutung, zählen aber nicht zu den klassischen Autophagie-assoziierten Genen. Auch hier sollte untersucht werden, ob die Regulierung der Transkription durch Miz1 alleine, oder in Kombination mit Myc geschieht. Zur Expressionsanalyse wurden die Gene *Pikfyve*, *Exoc2*, *Ambra1*, *Vamp4* und *Spast* (kodiert für Spastin) ausgewählt. Auch hier wurde die Höhe der Genexpression von Myc-Zellen, die mit Medium behandelt wurden, mit 1 gleichgesetzt und die ermittelten Expressionen in allen anderen Bedingungen als die n-fache Expression dieses Gens dargestellt.

Bei ausreichender Nährstoffversorgung unterschied sich die Expression von *Ambra1* und *Exoc2*, *Pikfyve* und *Spast* in den Zellen, die die unterschiedlichen Konstrukte überexprimierten, kaum (siehe Abb. 3.1-28 a, b, c, e). Der Mittelwert der *Vamp4*-Expression war in Zellen, die Myc überexprimierten im Vergleich zu Kontrolle leicht erhöht (ShScr-Mittelwert: 0.815, Myc-Mittelwert:1; statistisch nicht signifikant). In Zellen, die mit dem MycVD-Konstrukt infiziert waren, lag der Expressionswert für *Vamp4* mit 0,9 genau dazwischen, wobei die drei Messwerte hier stark um den Mittelwert streuten (siehe Abb.3.1-28d). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Expression der getesteten

Gene unter nährstoffreichen Bedingungen weder von Myc noch von der Interaktion zwischen Myc und MycVD abhängt.



Durch die Induktion von Autophagie stieg in den Zellen, die mit dem Kontrollvektor ShScr infiziert waren, die Expression von von *Ambra1* (rG Medium: 1.08, rG EBSS: 1.9), *Spast* (rG Medium: 1,24, rG EBSS: 1.95) und *Pikfyve* (rG Medium: 1.14, rG EBSS: 1.48) leicht an (siehe Abb. 3.1-28 a, c, e).

Die Expression von *Exoc2* und *Vamp4* hingegen blieb durch die Zugabe von EBSS nahezu unverändert (siehe Abb. 3.1-28 b, d). In Zellen, die das Myc-Konstrukt überexprimierten, zeigte sich bei keinem der getesteten Gene eine nennenswerte Expressionsinduktion durch die Behandlung mit EBSS. Die Expression von *Exoc2* (rG Medium: 1, rG EBSS: 0.91) und *Vamp4* (rG Medium: 1, rG EBSS: 0.87) fiel unter diesen Bedingungen sogar leicht ab (siehe Abb. 3.1-28 b, d). In Zellen, die die MycVD-Mutante überexprimierten, ließ sich die Expression von *Ambra1* (rG Medium: 1.15, rG EBSS: 1.63) und *Spast* (rG Medium: 1.05, rG EBSS: 1.7, p-Wert: <0.01) unter dem Einfluss von EBSS leicht induzieren.

Beim Vergleich der Zellen, die mit dem Myc-Konstrukt infiziert waren, mit denen, die MycVD überexprimierten, fanden sich bezüglich der EBSS-Wirkung auf die Genexpression kaum Unterschiede. Bei *Ambra1* zeigte sich eine leichte Erhöhung der Genexpression in Zellen, die MycVD überexprimierten im Vergleich zu den Myc-Zellen. Lediglich die Expression von *Spast* unterschied sich mit einem p-Wert von <0,05 signifikant in den beiden Zelltypen (rG Myc EBSS: 1.12, rG MycVD EBSS: 1.7).

Ähnlich wie bei den Atg-Genen scheint die Interaktion von Myc und Miz1 einen hemmenden Einfluss auf die Expression von *Ambra1* und *Spast* zu haben. Die restlichen getesteten Gene scheinen durch die Interaktion von Miz1 und Myc unbeeinflusst.

3.1.8 Transfektion von HC11-Zellen mit GFP-LC3-Plasmiden

Mit dem Ziel, den Einfluss von Miz1 auf Autophagie in Echtzeit untersuchen zu können, wurden HC11-Zellen mit einem GFP-markiertem LC3-Vektor stabil transfiziert. Hierfür standen verschiedene LC3-Plasmide zur Verfügung (siehe Tabelle 3.1). Die vorhandene Plasmid-DNA wurde mittels Maxipräparation vervielfältigt (siehe Abschnitt 2.3.6.4). Um zu überprüfen, ob es sich bei den Plasmiden tatsächlich um die gewünschten Konstrukte handelte, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.7). Restriktionsenzyme erkennen spezifisch DNA-Sequenzen und schneiden die DNA genau an dieser Stelle, sodass bei bekannter Plasmidlänge mehrere DNA-Fragmente einer bestimmten, vorhersagbaren Größe entstehen, die mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden können.

Für den Verdau wurden jeweils zwei passende Enzyme (siehe Tabelle 3.1) ausgewählt, mit denen die entsprechende Plasmid-DNA für zwei Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die

Fragmente der Größe nach in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 3.1-29). Die zu erwartenden Fragmentlängen wurden mit Hilfe der Informationen über die Vektorsequenzen, die auf der Internetseite der Bezugsfirma (<https://www.addgene.org/>) zu finden waren, ermittelt.

Für das ptfLC3-Plasmid entstanden durch den Enzymverdau genau die erwarteten Fragmente (vergleiche Tabelle 3.1 und Abb. 3.1-29 dritte Spalte von links). Bei dem pEGFP-LC3-Vektor stellte sich das Fragment mit unbekannter Größe als circa 400 bp groß heraus.

Name des Plasmids	Spezies (LC3)	Größe des Vektors	Größe des Inserts	Resistenz 1) Bakterielle Resistenz 2) Kultur Resistenz	Verwendete Restriktionsenzyme	Erwartete Fragmentlängen
<i>pBABE-puromCherry-EGFP-LC3B</i>	Mensch	5169 bp	1900 bp	1) Ampicillin 2) Puromycin	PST1, Sal1	2244 bp, 176 bp, 872 bp, 3777 bp
<i>pEGFP-LC3</i>	Mensch	4700 bp	unbekannt	1) Kanamycin 2) unbekannt	EcoR1, BamH1	4700 bp, unbekannt
<i>ptfLC3</i>	Ratte	5200 bp	738 bp	1) Kanamycin 2) Neomycin	Bgl2, EcoR1	738 bp, 5200 bp
<i>pBABEpuro GFP-LC3</i>	Ratte	5169 bp	1500 bp	1) Ampicillin 2) Puromycin	PST1, Sal1	1844 bp, 176 bp, 872bp, 3777bp
<i>pEX-GFP-hLC3WT</i>	Mensch	6000 bp	378 bp	1) Ampicillin 2) Neomycin	Bgl2, Stu1	233 bp, 6145 bp
<i>pEX-GFP-hLC3ΔG</i>	Mensch	6000 bp	375 bp	1) Ampicillin 2) Neomycin	Bgl2, Stu1	232 bp, 6143 bp

Tabelle 3.1: Vektorinformationen. Alle Vektoren wurden von der Firma Addgene bezogen.

Bei dem Verdau der beiden pEX-Vektoren (pEX-GFP-hLC3WT und pEX-GFP-hLC3ΔG) entstand jeweils eine zusätzliche Bande (ca.700bp), die wahrscheinlich aufgrund einer zusätzlichen Schnittstelle für eines der beiden verwendeten Enzyme aufgetreten ist. Da die Sequenz des Trägervektors (pCXN2) leider nicht bekannt war, konnte diese nicht überprüft werden. Die beiden pBABEpuro-Vektoren (pBABEpuro mCherry-EGFP-LC3 und pBABEpuro Gfp-LC3) zeigten zum einen jeweils einige Banden (Abb. 3.1-29: rote Markierung), die sich nicht eindeutig den erwarteten Fragmentgrößen zuordnen ließen und zum anderen Banden, die zusätzlich zu den Erwarteten auftraten. Das könnte daran liegen,

dass den Restriktionsenzymen nicht genügend Zeit gegeben wurde die komplette DNA-Probe zu schneiden, sodass zum Ende der Inkubationszeit neben den geschnittenen Fragmenten auch noch unverdaute DNA vorlag. Diese unverdaute DNA hat dann im Elektrophoresebild zu den zusätzlichen Banden geführt. Um einen vollständigen Verdau zu erreichen, wurden die zwei Proben erneut mit den gleichen Restriktionsenzymen für vier Stunden inkubiert (nicht dargestellt). Die Tatsache, dass nach vierstündigem Verdau der Plasmide die Summe der entstandenen Einzelfragmente immer noch größer als die vorbekannte Vektorgröße war, spricht dafür, dass immer noch zusätzlich unverdaute DNA vorgelegen haben muss. Da diese beiden Vektoren vorerst nicht zur Transfektion der Zellen benutzt werden sollten, hat kein weiterer Versuch mit verlängerter Inkubationszeit stattgefunden.

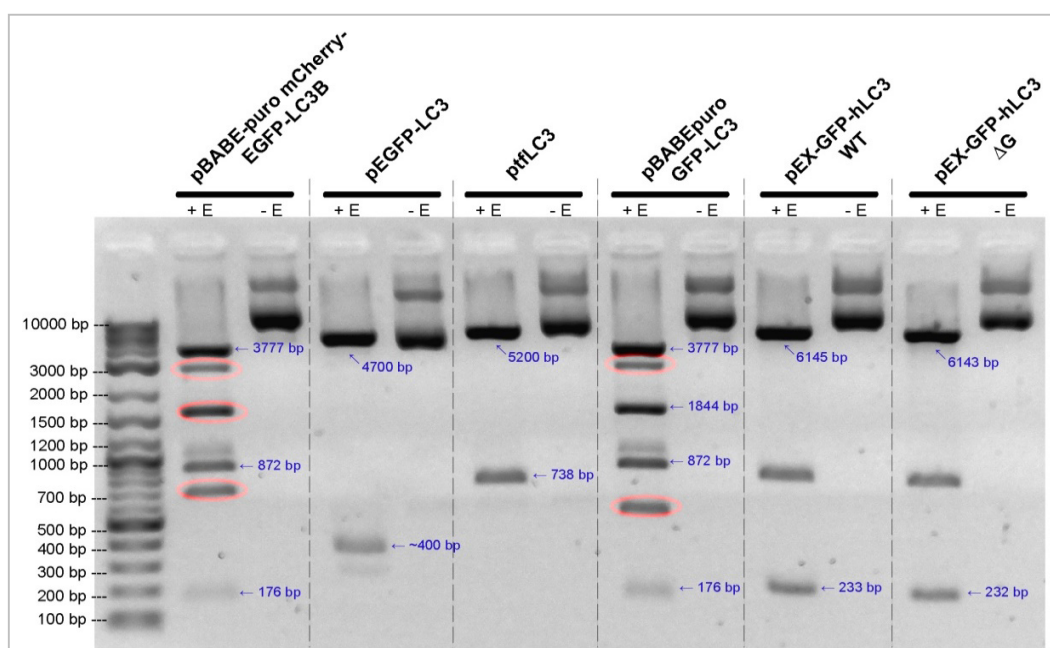


Abbildung 3.1-29: Restriktionsenzymverdau der LC3-Plasmide. Die verschiedenen Plasmidvektoren wurden jeweils mit den in Tabelle 3.1 genannten Restriktionsenzymen für 2h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde auf der ersten Spur links eine log₂-DNA-Leiter aufgetragen. Jeder Vektor wurde einmal mit (jeweils linke Spur) und einmal ohne Restriktionsenzyme (jeweils rechte Spur) inkubiert. In blau wurden die erwarteten Fragmente gekennzeichnet; rot eingekreist wurden Banden, die nicht mit den erwarteten Fragmentgrößen übereinstimmen bzw. zusätzlich aufgetreten waren.

Für die Transfektion der HC11-Zellen wurden die pEX-GFP-hLC3WT- und pEX-GFP-hLC3ΔG-Plasmide ausgewählt. Bei dem pEX-GFP-hLC3ΔG-Konstrukt handelt es sich um einen Kontrollvektor, der die Formation von LC3-Punkten nicht zulässt (Tanida et al., 2008). Dem LC3ΔG-Protein fehlt ein C-terminaler Glycin-Rest, der für die Lipidierung von LC3-I nötig ist. Folglich können durch Induktion von Autophagie in einer Zelle kein LC3-II und damit auch keine fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Punkte entstehen. Der Vorteil eines solchen Kontrollvektors ist, dass von der LC3-Konjugation

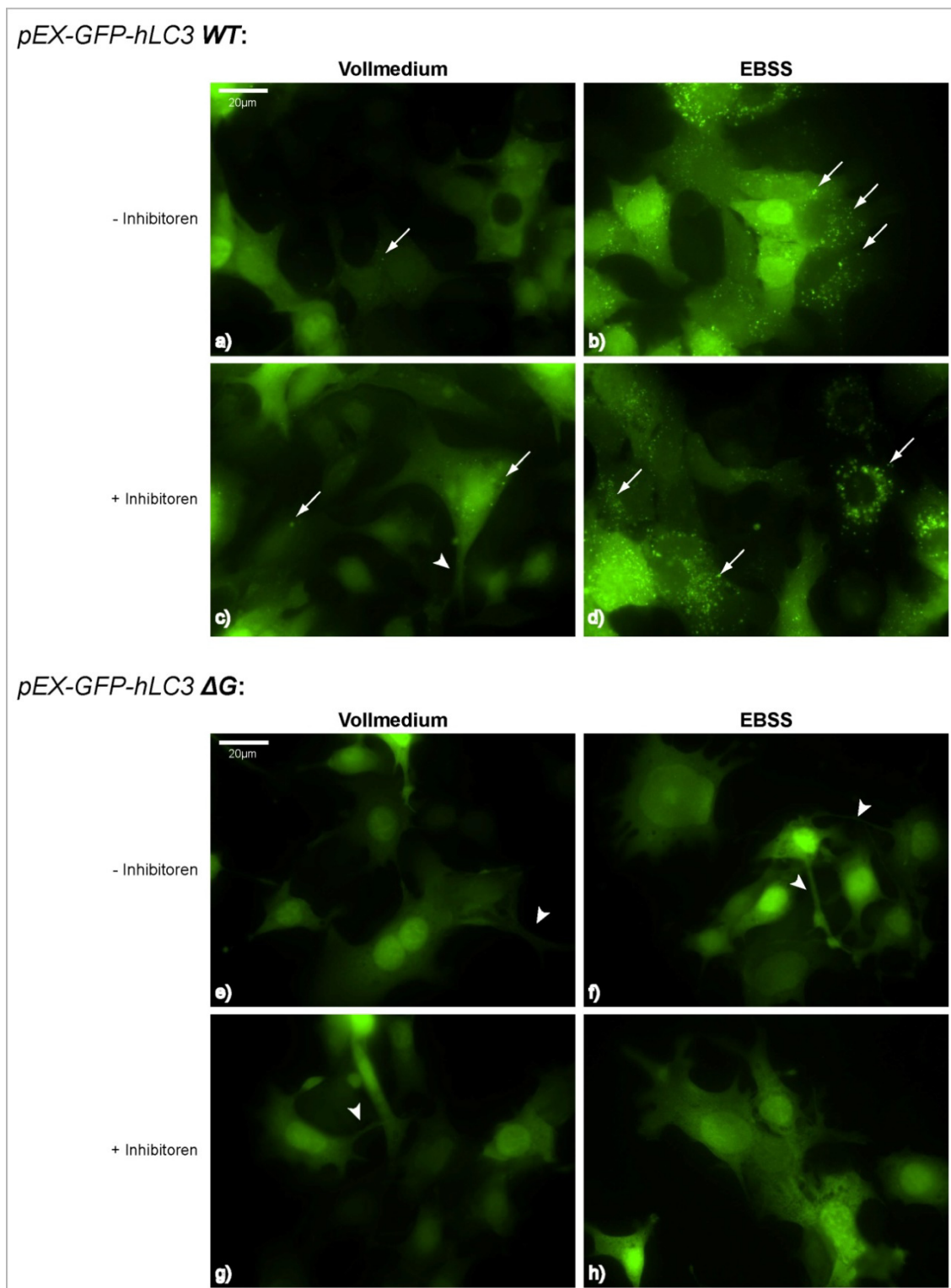


Abbildung 3.1-30: Autophagie-Induktion in Zellen, die pEX-GFP-hLC3WT und pEX-GFP-hLC3ΔG überexprimieren. In LabTex®s wurden HC11-Zellen, die mit dem pEX-GFP-hLC3WT-Vektor (a – d), sowie HC11-Zellen, die mit dem pEX-GFP-hLC3ΔG-Vektor (e – h) transfiziert waren, jeweils für 6 h in Vollmedium (a + c + e + g) und EBSS (b + d + f + h), mit (c + d + g + h) und ohne Inhibitoren (a + b + e + f), inkubiert und anschließend fixiert. Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft auf LC3-Punkte, die Pfeilspitzen deuten auf die Ausläufer der Zellen.

unabhängige LC3-Proteinaggregate identifiziert werden können. Diese unspezifischen Akkumulationen treten vor allem dann auf, wenn Zellen ein Protein, wie in diesem Fall das LC3, überexprimieren.

Die Transfektion der Zellen erfolgte durch die Lipofectamine™ 2000-Methode. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden 90-95%ig konfluente Zellen in 55cm²-Kulturschalen verwendet. Je Vektor wurden 24 µg DNA und 60 µl Lipofectamine™ 2000 eingesetzt. Die einzelnen Schritte dieser Transfektionsmethode sind in Abschnitt 2.2.6.1 genauer beschrieben. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen gesplittet und mit Selektionsmedium versehen. Zur Selektion wurde das Antibiotikum Geneticin (=Neomycin) in einer Endkonzentration von 300 µg/ml benutzt. Nun wurde einige Tage gewartet, bis größere Zellkolonien gewachsen waren, welche dann mit Hilfe von Klonierungsringsen (siehe Abschnitt 2.2.6.2) spezifisch abtrypsiniert und in eine 24-Well-Platte übersiedelt werden konnten. Nachdem die Klone dicht gewachsen waren, wurden sie in die entsprechend größere Kulturschale gesät.

Als nächstes sollte die Funktion der eingeschleuften Vektoren überprüft werden. Hierfür wurden die beiden transfizierten Zelltypen in Lab-Tek®s ausgesät und am folgenden Tag für sechs Stunden in normalem Nährmedium und EBSS, jeweils mit und ohne Inhibitoren, inkubiert (siehe Abb. 3.1-30).

HC11-Zellen, die den pEX-GFP-hLC3WT-Vektor überexprimierten, formten bei Inkubation in normalem Nährmedium, sowohl bei Behandlung mit als auch ohne Inhibitoren, nur vereinzelt LC3-Punkte (siehe Abb. 3.1-30 a, c). Wurden diese Zellen hingegen mit EBSS inkubiert, bildeten sich in beinahe allen Zellen reichlich LC3-Punkte, die im gesamten Zytoplasma verteilt und in Nähe des Zellkerns gehäuft zu finden waren (siehe Abb. 3.1-30 b). Dasselbe war auch in den Zellen zu beobachten, die zusätzlich mit Inhibitoren behandelt worden waren (siehe Abbildung 3.1-30 d). Um den Effekt der Inhibitoren besser beurteilen zu können, wäre allerdings eine Quantifizierung der LC3-Punkte notwendig gewesen. Im Vergleich zu endogenen LC3-Punkten (vergleiche Abb. 3.1-2 b + d) erschienen diese LC3-Punkte kleiner und zahlreicher. In den Zellen, die den pEX-GFP-hLC3ΔG-Vektor überexprimierten und damit laut Hersteller nicht zur Autophagosomenformation fähig sind, konnten wie erwartet bei keiner der vier Bedingungen LC3-Punkte beobachtet werden (siehe Abb. 3.1-30 e-h). Die Zellen zeigten ein homogen grün-fluoreszierendes Zytoplasma. Bei beiden der transfizierten Zelltypen, besonders bei dem, der den pEX-GFP-hLC3ΔG-Vektor überexprimierte, fiel auf, dass die Zellen im Vergleich zu normalen, nicht-transfizierten HC11-Zellen mehrere dünne, lange Ausläufer bildeten (siehe Abbildung 3.1-30 e-g Pfeilspitzen).

Aus zeitlichen Gründen kamen diese Zellen leider nicht mehr für Miz1-Knockdown Experimente zur Anwendung.

3.2 Autophagie in MEFs in Abhängigkeit von Miz1

In HC11-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Miz1 und die Bindung von Miz1 an Myc den autophagischen Prozess beeinflussen. Da sich in dieser Zelllinie aber sowohl durch short-hairpin-RNA-Interferenz, als auch durch siRNA (nicht dargestellt) kein zufriedenstellender Miz1-Knockdown erreichen ließ, wurde zur Untersuchung der Autophagie unter Miz1-Suppression ein anderes Zellmodell herangezogen.

3.2.1 Die Zelllinie Δ POZ/Cre-ER-MEFs

Bei den Δ POZ/Cre-ER-MEFs handelt es sich um embryonale Mausfibroblasten, in denen mit Hilfe des Östrogenrezeptor-Modulators Tamoxifen ein Miz1-Knockdown induziert werden kann. Diese Zelllinie wurde aus Miz1/ Δ POZ-Knockout-Mäusen generiert. Bei den Miz1/ Δ POZ-Mäusen ist die Sequenz, die für die POZ-Domäne kodiert an beiden Seiten von einer LoxP-Schnittstelle flankiert, die von Cre-Rekombinasen erkannt und geschnitten werden kann.

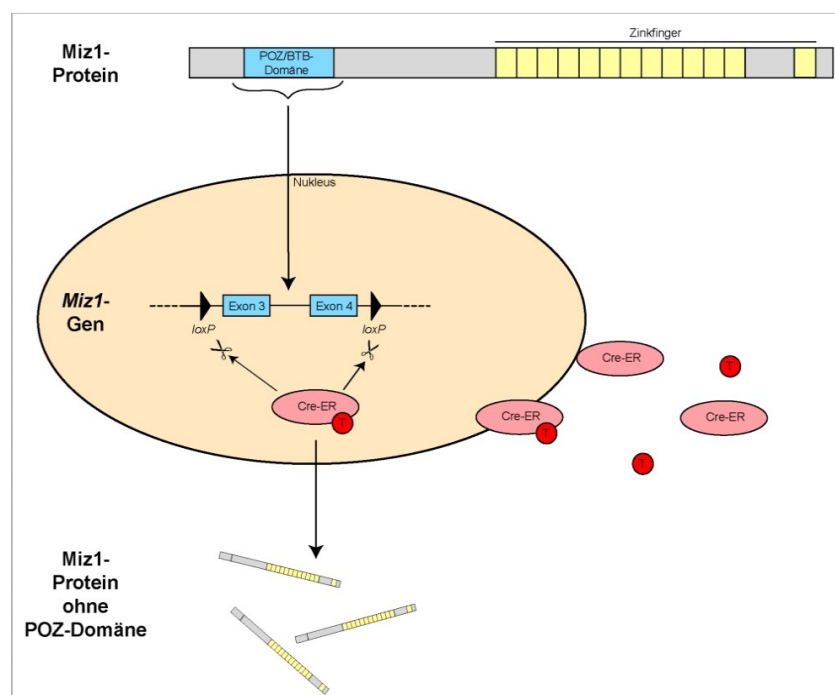


Abbildung 3.2-1: Vereinfachtes Schema des konditionellen Miz1-Knockouts in MEFs. Die Zellen exprimieren die Cre-ER-Rekombinase, ein Enzym, an das ein mutierter Östrogen-Rezeptor gebunden ist, der endogene Östrogene nicht bindet, aber durch exogen zugeführtes Tamoxifen aktiviert werden kann. Durch die Bindung von Tamoxifen wird das Enzym dazu befähigt, in den Zellkern zu wandern und an den loxP-Schnittstellen, die hier die POZ-Domäne flankieren, zu schneiden. Dadurch entsteht ein Miz1-Protein, das keine POZ-Domäne enthält und dadurch keine transkriptionelle Aktivität aufweist.

Nach Gewinnung der primären Zellen wurden diese mit einem Cre-ER-Plasmid transfiziert. Durch das Plasmid sind transfizierte Zellen in der Lage, das Enzym Cre-ER-Rekombinase zu bilden. Das Enzym ist an einen mutierten Östrogenrezeptor gebunden, welcher endogene Östrogene nicht binden kann, wohl aber exogen zugeführtes Tamoxifen. Die Cre-ER-Rekombinase kommt in ihrer inaktiven Form normalerweise nur im Zytoplasma vor. Werden die Zellen nun aber mit Tamoxifen inkubiert, wird die Cre-ER-Rekombinase aktiviert und ist in diesem Zustand fähig, in den Zellkern zu gelangen. Dort kann es die DNA an Lox-P-Schnittstellen, in diesem Fall neben der POZ-Sequenz, schneiden und damit einen induzierten Knockdown bewirken. Das Cre-ER-Plasmid enthält ein Antibiotika-Resistenzgen für Puromycin, das für die Selektion der transfizierten Zellen entscheidend ist. Nach Zugabe von Puromycin wuchsen sechs Zellkolonien, in denen nun überprüft werden sollte, ob sich durch Inkubation mit Tamoxifen ein Miz1-Knockdown induzieren lässt.

Dazu wurden die sechs Klone in je vier Wells einer 24-Well-Platte ausgesät und nach einem Tag für weitere 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 μM , 0,05 μM , 0,01 μM) von Tamoxifen versehen. Zur Kontrolle wurde pro Klon ein Well ohne Tamoxifen gelassen. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde DNA extrahiert und mittels semiquantitativer PCR die Wirksamkeit der Cre-ER-Rekombinase analysiert. Hierfür kamen drei verschiedene Primer für den Nachweis der rekombinanten Miz1-Bande und ein Primer-Paar zur Überprüfung des Cre-Gens zum Einsatz.

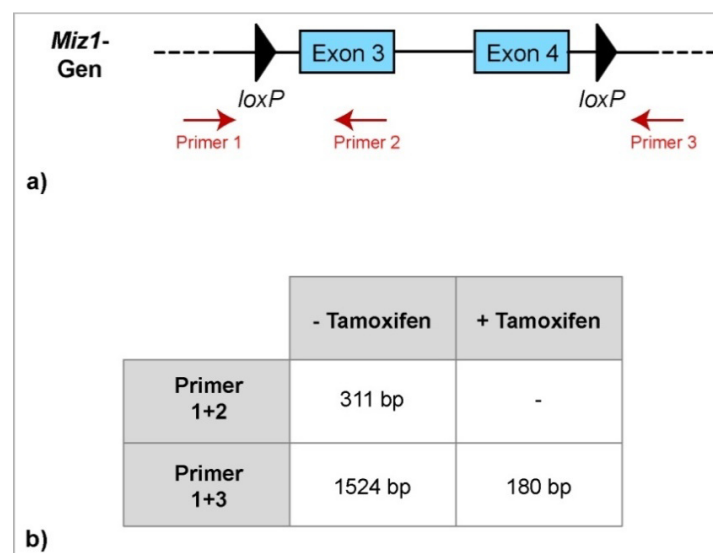


Abbildung 3.2-2: Darstellung der Miz1-Primer-Positionen und der zugehörigen Amplifikate. In Abbildung a sind die Primer-Bindungsstellen der drei eingesetzten Primer gezeigt. In Tabelle b sind die resultierenden Amplifikate für die beiden Primer-Kombinationen mit und ohne Zugabe von Tamoxifen aufgelistet.

In Zellen, die nicht mit Tamoxifen behandelt wurden, bei denen also die Sequenz für die POZ-Domäne noch vorhanden ist, soll durch das Primer-Paar 1 und 2 ein 311 bp großes, sowie durch die Primer 1 und 3 ein 1524 bp großes DNA-Fragment entstehen. Durch die Zugabe von Tamoxifen wird die entsprechende Sequenz ausgeschnitten, wodurch die Bindungsstelle für Primer 2 wegfällt. Für Primer 1 und 3 wird nach Ausschneiden der POZ-Sequenz und anschließender Neuverknüpfung der dadurch entstandenen freien DNA-Enden ein 180 bp großes DNA-Stück gebildet, die sogenannte rekombinante Bande.

In allen sechs Klonen konnte die Expression von Cre-ER nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2-3). Bei Klon 3 wurde in der zweiten Bande wahrscheinlich vergessen, einen der Cre-Primer, sowie Miz1-Primer 3, zuzugeben.

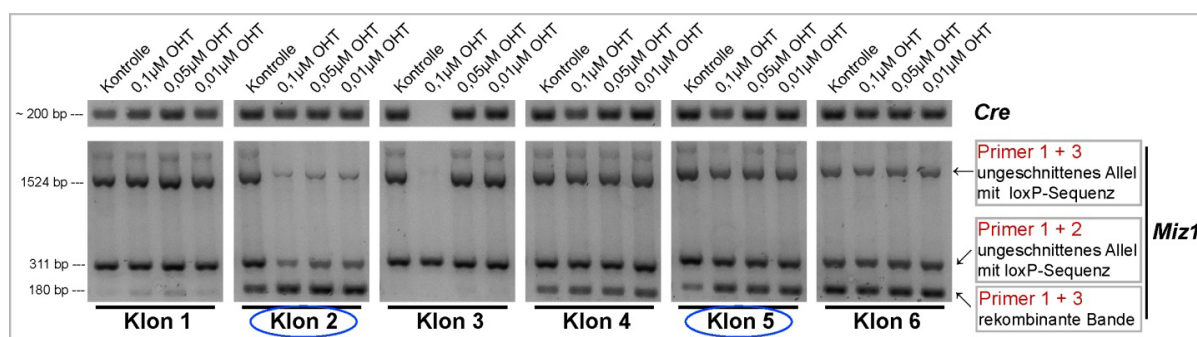


Abbildung 3.2-3: Rekombination des Miz1-Allels in Δ POZ/Cre-ER-MEFs unter Tamoxifen-Behandlung. Die verschiedenen Klone wurden für 24h mit unterschiedlichen Tamoxifen-Konzentrationen (OHT) inkubiert. Bei der linken Bande handelt es sich jeweils um eine Kontroll-Probe, die anstelle von Tamoxifen mit einer entsprechenden Menge an Ethanol versehen wurde. Anschließend wurde mit spezifischen Primern die Expression von Cre und das Auftreten der rekombinanten Bande im Miz1-Allel analysiert. In rot wurden jeweils die Primer-Paare markiert, die das mit dem Pfeil markierte Fragment erzeugten. Die blau markierten Klone 2 und 5 wurden zunächst für weitere Experimente ausgewählt.

In den Klonen 1 und 3 ließen sich vor allem die beiden ungeschnittenen Miz1-Allele nachweisen. In Klon 1 ließ sich eine sehr schwache rekombinante Bande erkennen, in Klon 3 war die rekombinante Bande nicht sichtbar. Das spricht dafür, dass in diesen Zellen der induzierte Miz1-Knockdown nicht funktioniert hat. In den Klonen 4, 5 und 6 war das rekombinante Allel jeweils deutlich ausgeprägt. Allerdings waren auch die beiden ungeschnittenen Miz1-Banden noch sehr gut erkennbar, was bedeutet, dass die Cre-ER-Rekombinase zwar durch das Tamoxifen aktiviert wurde, aber nicht ausreichend, um die POZ-Sequenz in allen Zellen komplett auszuschneiden. Die Abnahme der ungeschnittenen Miz1-Allele konnte nur in Klon 2 beobachtet werden, weshalb sich für diese Zellen ein erfolgreicher Miz1-Knockdown annehmen ließ. Auffällig war, dass sich in den Klonen 2, 4, 5 und 6 auch in der Kontrollprobe, der kein Tamoxifen zugefügt wurde, eine rekombinante Bande nachweisen ließ. In Klon 5 war die Bande im Vergleich zu den mit Tamoxifen inkubierten Proben aber etwas

schwächer. Die Induktion der Cre-ER-Rekombinase ist hier also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Zugabe von Tamoxifen zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der rekombinanten Bande in den Tamoxifen-freien Proben könnte das Phenolrot sein, das im Nährmedium der MEFs als Indikatormittel vorkommt. Es gibt Hinweise dafür, dass Phenolrot selbst als schwaches Steroid wirken kann (Berthois et al., 1986). Somit könnte es an den Östrogenrezeptor der Cre-ER-Rekombinase binden, wodurch das Enzym eventuell bereits ohne die Zugabe von Tamoxifen aktiviert werden würde. Aus diesem Grund wurde für das nächste Experiment das Phenol mittels Aktivkohle aus dem Medium entfernt. Wegen der Reduktion der ungeschnittenen Allele in Klon2 und der vergleichsweise schwachen rekombinanten Bande der Kontrollprobe von Klon5, wurden diese beiden Klone zunächst gewählt, um zu untersuchen, ob durch eine verlängerte Inkubation in Phenolrot-freiem Medium der Zellen mit Tamoxifen eine stärkere Herunterregulierung von Miz1 möglich ist. Wie im ersten Experiment wurden die Zellen der beiden Klone in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit denselben Konzentrationen (0,1 μ M, 0,05 μ M, 0,01 μ M) von Tamoxifen für 24, 48 und 72 Stunden versehen.

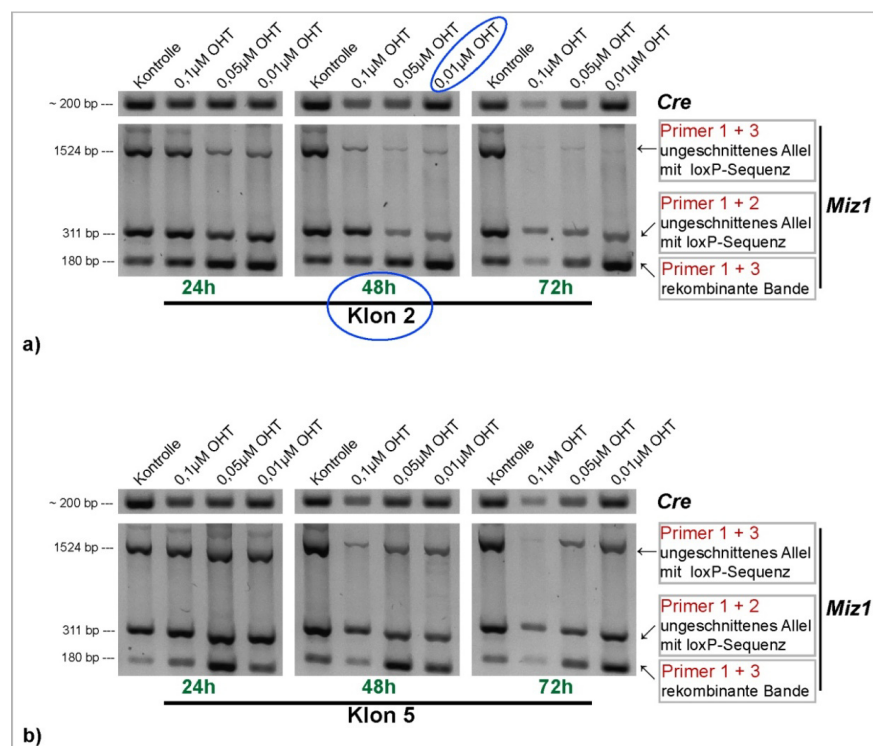


Abbildung 3.2-4: Rekombination des Miz1-Allels in Δ POZ/Cre-ER-MEFs unter verlängerter Tamoxifen-Behandlung. Die Klone 2 (a) und 5 (b) wurden für 24, 48 und 72h mit unterschiedlichen Tamoxifen-Konzentrationen (OHT) inkubiert. Bei der linken Bande handelt es sich jeweils um eine Kontroll-Probe, die anstelle von Tamoxifen mit einer entsprechenden Menge an Ethanol versehen wurde. Anschließend wurde mit spezifischen Primern die Expression von Cre und das Auftreten der rekombinanten Bande im Miz1-Allel analysiert. In rot wurden jeweils die Primer-Paare markiert, die das mit dem Pfeil markierte Fragment erzeugen. Die blau markierte Bedingung (Klon 2, 48h, 0,01 μ M OHT) wurde für die weiteren Experimente ausgewählt.

Bei Klon2 ließ sich gut erkennen, wie durch die verlängerte Tamoxifen-Behandlung die Menge der Amplifikate, die die POZ-Sequenz enthielten, abnahm (vergleiche Abbildung 3.2-4 a, 24 und 48 Stunden). Im Vergleich der 48-stündigen zu der 72-stündigen Tamoxifen-Behandlung waren in Bezug auf die nicht-geschnittenen Miz1-Allele kaum noch Unterschiede zu beobachten (vergleiche Abb. 3.2-4 a, 0,01 μ M OHT nach 48 und nach 72 Stunden). Die Abnahme der Bandenstärke bei 0,1 μ M und 0,5 μ M OHT nach 72 Stunden ist darauf zurückzuführen, dass in diesen Bedingungen die meisten Zellen gestorben waren. Der Einsatz von Medium ohne Phenol brachte leider nicht den gewünschten Erfolg, da nach wie vor die rekombinante Bande in der Kontrollbedingung zu sehen war. Klon5 zeigte zwar weiterhin eine schwächere rekombinante Bande in der Kontrollprobe als Klon2, allerdings nahm durch die OHT-Behandlung die Stärke der Banden in denen die POZ-Sequenz enthalten war, nicht ab (siehe Abbildung 3.2-4 b). Die Autophagie-Experimente im Folgenden wurden alle mit Klon2 durchgeführt. Um die Cre-ER-Rekombinase zu induzieren, wurden die Zellen für 48 Stunden in 0,01 μ M Tamoxifen inkubiert.

3.2.2 Morphologische Analyse der Δ POZ/Cre-ER-MEFs unter EBSS-Behandlung

Nachdem nun die besten Bedingungen für den Miz1-Knockdown gefunden waren, sollte in diesen Zellen Autophagie stimuliert werden. Zur Induktion von Autophagie wurde, wie bei den HC11-Zellen, auch hier EBSS verwendet. Die Δ POZ/Cre-ER-MEFs wurden in insgesamt acht 21cm²-Schalen ausgesät. Nach 48 Stunden wurde zu vier Schalen 0,01 μ M Tamoxifen hinzugegeben, die anderen vier Schalen wurden mit der entsprechenden Menge an Ethanol für weitere 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden pro Bedingung jeweils eine Schale in EBSS und eine Schale in Medium für sechs und für 24 Stunden inkubiert. Das EBSS wurde in der entsprechenden Bedingung ebenfalls mit Tamoxifen versehen. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen fotografiert und anschließend zur RNA-Extraktion geerntet.

Bei den Zellen, die für sechs Stunden in Medium bzw. EBSS inkubiert wurden, fanden sich in beiden Bedingungen keine morphologischen Unterschiede zwischen den Zellen, die Miz1 normal (= Miz1^{hi}-Zellen) exprimierten und denen, die mit Tamoxifen behandelt worden waren (= Miz1^{lo}-Zellen; siehe Abb. 3.2-5). Nach 24 Stunden jedoch zeigten die Miz1^{lo}-Zellen, die in EBSS inkubiert worden waren, im Vergleich zu denen, die in Medium wuchsen, ein spindelförmiges Aussehen (siehe Abb. 3.2-5 h, rote Markierung). Daraus ließ sich schließen, dass Zellen, in denen die Expression von Miz1 herunterreguliert ist, nährstoffarme Bedingungen schlechter verkraften, als Wildtyp-Zellen. Um die

Morphologie dieser Zellen genauer untersuchen zu können, wurden Δ POZ/Cre-ER-MEFs in Lab-Tek[®]s ausgesät und nach demselben Schema wie oben, mit oder ohne Tamoxifen und mit EBSS oder Medium behandelt.

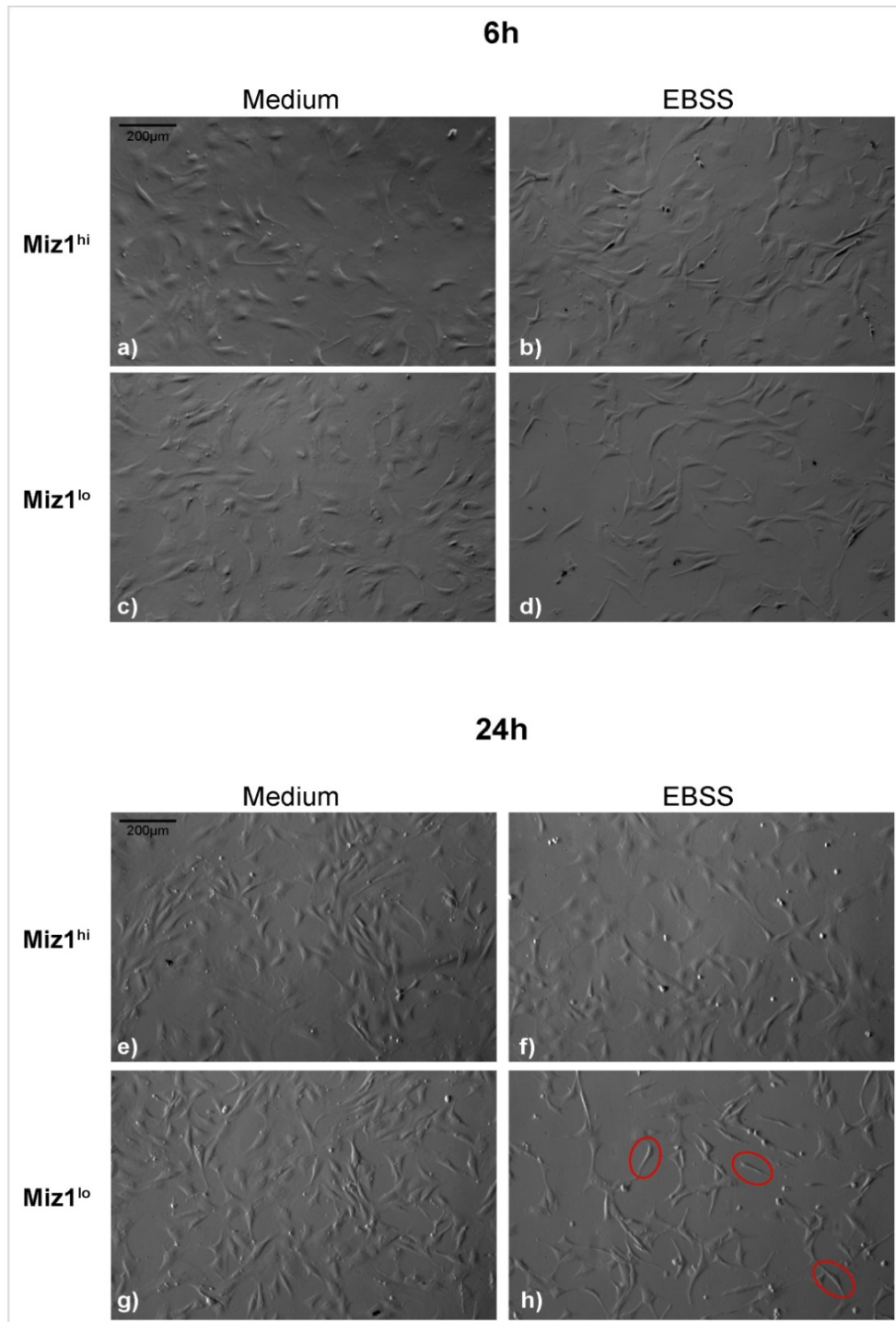


Abbildung 3.2-5: Morphologische Analyse der Δ POZ/Cre-ER-MEFs unter EBSS-Behandlung. Δ POZ/Cre-ER-MEFs wurden nach 48-stündiger Tamoxifen- (c + d + g + h) bzw. Ethanol-Behandlung (a + b + e + f) für 6 (a – d) und für 24 Stunden (e – h) in EBSS inkubiert und anschließend fotografiert.

Bei Kultivierung der Δ POZ/Cre-ER-MEFs in Lab-Tek[®]s fiel auf, dass sowohl bei Miz1^{hi}- als auch bei Miz1^{lo}-Zellen die Behandlung mit EBSS viel schlechter vertragen wurde, als in normalen Kulturschalen. Bereits nach zweistündiger Inkubation in EBSS (nicht dargestellt) begannen die Zellen sich in beiden Bedingungen vom Untergrund abzulösen und nach sechs Stunden (siehe Abbildung 3.2-6 b und d) zeigten die verbliebenen Zellen eine schmale, spindelförmige Zellform. Nach 24 Stunden (nicht dargestellt) waren nur noch sehr wenig adhärenente Zellen zu finden. Bei Kultivierung in normalem Nährmedium waren keine Unterschiede zwischen Miz1^{hi}- und Miz1^{lo}-Zellen zu beobachten. Da das Zytoplasma unter EBSS-Behandlung sowohl in Wildtyp-, als auch in Knockout-Zellen kaum beurteilbar war, konnten Fluoreszenz-Färbungen mit LC3-Antikörpern leider nicht quantitativ ausgewertet werden.

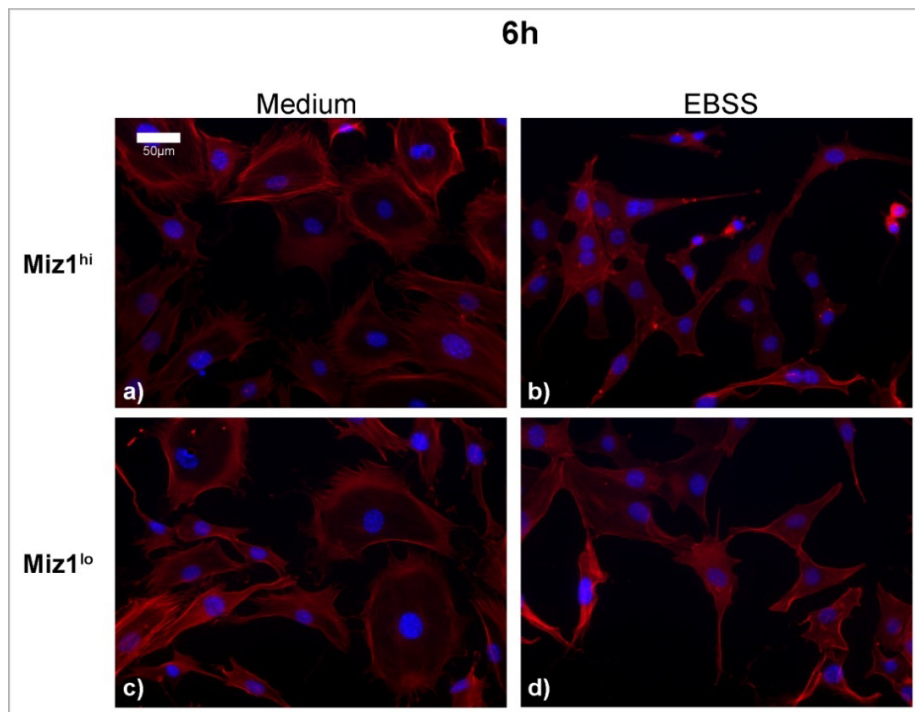


Abbildung 3.2-6: Morphologische Analyse der Δ POZ/Cre-ER-MEFs unter EBSS-Behandlung. Δ POZ/Cre-ER-MEFs wurden in Lab-Tek[®]s nach 48-stündiger Tamoxifen- bzw. Ethanol-Behandlung für 6h in EBSS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, Aktin-Fasern mit Phalloidin-TRIC (rot) gefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blau).

3.2.3 Genexpressionsanalysen in Δ POZ/Cre-ER-MEFs

3.2.3.1 Bestimmung eines geeigneten Housekeeping-Gens für die qRT-PCR

Die Wahl eines geeigneten Referenzgens ist notwendig, um Fehler in der Berechnung der relativen mRNA-Expression des zu untersuchenden Gens auszuschließen. Diese könnten zum Beispiel durch Fehler in der cDNA-Synthese entstehen. Als Referenzgen oder sogenanntes House-Keeping-Gen

werden normalerweise Gene verwendet, die für die Zellfunktion essentiell sind und deswegen unter jeder Bedingung exprimiert werden. Wichtig ist, dass sich die Expression des Referenzgens durch innere, sowie äußere Einflüsse nicht verändert. Die Ermittlung des besten House-Keeping-Gens sollte für jede Zelllinie individuell und für alle experimentellen Bedingungen durchgeführt werden.

Um das am besten geeignete Referenzgen für die Δ POZ/Cre-ER-MEFs zu finden, wurden folgenden Referenzgene getestet: *Hydroxymethylbilan-Synthase (Hmbs)*, *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase1 (Hprt)*, *Succinat-Dehydrogenase Subunit A (Sdha)*, *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)*, β -Aktin und *Ubiquitin-60s ribosomal protein L40 fusion protein (Ubi 1)*.

Die Δ POZ/Cre-ER-MEFs wurden zwei Tage nach der Aussaat für weitere 48 Stunden mit Tamoxifen bzw. einer adäquaten Menge an Ethanol als Kontrolle behandelt. Danach wurde sowohl in den mit Tamoxifen behandelten Zellen, als auch in den Kontroll-Zellen für sechs Stunden durch Inkubation mit EBSS Autophagie induziert. Zum Vergleich wurden jeweils auch Zellen für die gleiche Zeit in normalem Nährmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, die RNA aufgereinigt und zur cDNA-Herstellung verwendet. Die relative Genexpression der oben genannten Gene wurde mittels qRT-PCR gemessen.

Die Referenzgenanalyse erfolgte durch die Computer-Software GenEx, welches mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden (GeNorm und Normfinder) das passende Housekeeping-Gen ermittelt. Durch die GeNorm-Methode (Vandesompele et al., 2002) wird ein sogenannter M-Wert bestimmt, wobei sich die besten Referenzgene einer Gruppe durch den kleinsten M-Wert auszeichnen. Hierzu werden in den verschiedenen Bedingungen die Expression eines bestimmten Referenzgens mit den Expressionen von einzelnen anderen Referenzgenen paarweise verglichen. Der M-Wert ergibt sich dann aus der Bildung des Mittelwerts einer ermittelten Gen-Paar-Variation in den verschiedenen Bedingungen. Durch Ausschluss der Gen-Paare mit hohen M-Werten ermittelt das Programm ein geeignetes Referenzgen-Paar. Wichtig ist dabei, dass die beiden Gene nicht koreguliert werden.

Mit Hilfe der Normfinder-Methode (Andersen et al., 2004) wird der Stabilitätswert (SD-Wert) eines Referenzgens mit Hilfe eines mathematischen Modells berechnet. Im Unterschied zu GeNorm erhält man hier nicht ein Referenzgen-Paar, sondern nur ein bestes Referenzgen. Außerdem kann unter Verwendung dieses Programms auch ein Referenzgen in verschiedenen Gruppen ermittelt werden, zum Beispiel aus verschiedenen Zelllinien. Mit Hilfe der GeNorm-Methode wurden *Hmbs* und *Hprt* als das am stabilsten exprimierte Referenzgen-Paar ermittelt (M-Wert: 0,318). Die NormFinder-Methode berechnete ebenfalls für *Hprt* den kleinsten SD-Wert (0,159), weshalb dieses für alle folgenden Experimente als Referenzgen verwendet wurde.

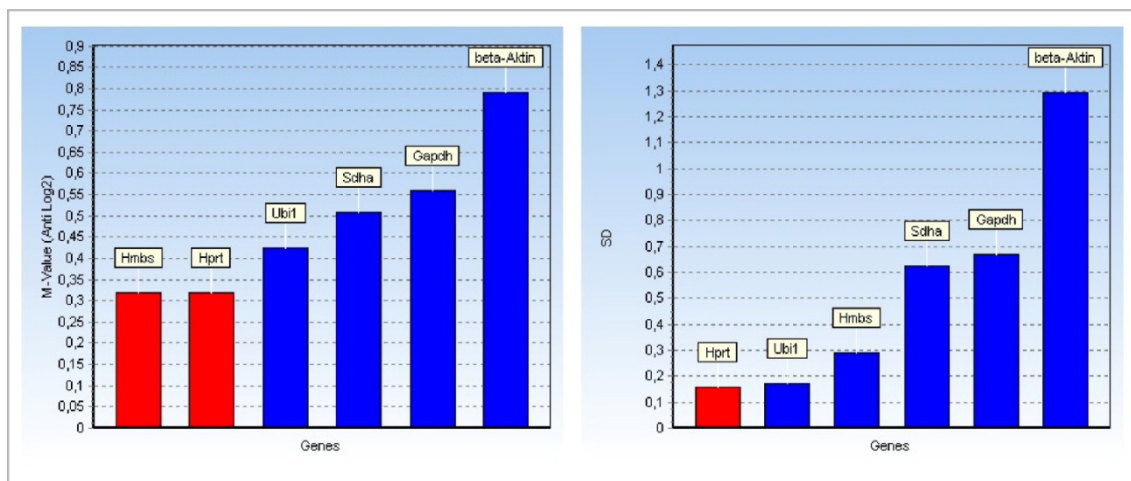


Abbildung 3.2-7: Ermittlung des geeigneten Referenzgens nach der GeNorm- und der NormFinder-Methode. Nach 48-stündiger Behandlung mit Tamoxifen bzw. Ethanol wurden die Δ POZ/Cre-ER-MEFs für 6 h in EBSS bzw. Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufbereitet und mittels Real-time-PCR analysiert. Durch die beiden Programme GeNorm (links) und NormFinder (rechts) wurde das geeignete Referenzgen ermittelt.

3.2.3.1 Nachweis des Miz1-Knockdowns in Δ POZ/Cre-ER-MEFs mit Hilfe der qRT-PCR

Um den Miz1-Knockdown auf mRNA-Ebene ebenfalls zu zeigen, wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben, zwei Tage nach dem Aussäen für 48 Stunden mit Tamoxifen oder Ethanol behandelt und anschließend durch EBSS für sechs Stunden zur Autophagie angeregt. Nach dem Ernten der Zellen, wurden diese für die qRT-PCR aufbereitet. In Abbildung 3.2-8 wurde für die verschiedenen Bedingungen die n-fache Expression des Miz1-Gens im Vergleich zu der in Medium ohne Tamoxifen gemessenen Genexpression (=1) dargestellt.

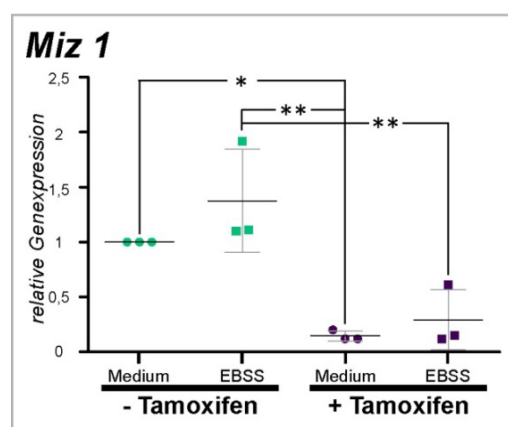


Abbildung 3.2-8: Miz1-Expression in Δ POZ/Cre-ER-MEFs nach 48-stündiger Behandlung mit Tamoxifen. Δ POZ/Cre-ER-MEFs wurden für 48h in 0,01 μ M Tamoxifen bzw. in einer entsprechenden Menge Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie für 6h in normalem Nährmedium bzw. EBSS inkubiert und danach geerntet. In der Abbildung wurden der Mittelwert, sowie die Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanzen wurden in einer einfaktoriellem ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

Es ist erkennbar, dass durch die Behandlung mit Tamoxifen ein Miz1-Knockdown von circa 85% erreichen ließ (vergleiche Abb. 3.2-8 Medium/–Tamoxifen und Medium/+Tamoxifen; Mittelwert der relative mRNA-Expression nach Tamoxifen-Behandlung: 0,15). Ähnlich wie bei den HC11-Zellen ließ sich sowohl in der Bedingung mit, als auch in der ohne Tamoxifen-Behandlung Miz1 durch eine sechsstündige Behandlung mit EBSS leicht induzieren (rG: -Tamoxifen/+EBSS: 1,37; rG: +Tamoxifen/+EBSS: 0,29). Allerdings weicht in beiden EBSS-Konditionen einer der drei Messwerte stark vom Mittelwert ab, was zu der relativ großen Standardabweichung führte.

3.2.3.2 Expression Autophagie-assoziiierter Gene in Δ POZ/Cre-ER-MEFs

In diesem Zellmodell sollte nun der Einfluss von Miz1 auf die Expression einiger Autophagie-assoziiierter Gene getestet werden. Hierzu wurden *Atg 4c*, *Atg 5*, *Atg 7* und *Atg9b* ausgewählt, da diese Gene in früheren Experimenten dieser Arbeitsgruppe in einem anderen Zellmodell als durch Miz1 reguliert beschrieben wurden (Oppenheimer, 2009). Die gemessene Genexpression von *Atg9b* wurde im Folgenden aber nicht dargestellt, da es in den Δ POZ/Cre-ER-MEFs so schwach exprimiert wurde, dass die Vertrauenswürdigkeit der Daten in Frage gestellt war. Auch hier wurde die Höhe der Genexpression von Δ POZ/Cre-ER-MEFs, die mit Medium und ohne Tamoxifen behandelt waren, mit 1 gleichgesetzt und die ermittelten Expressionen in allen anderen Bedingungen als die n-fache Expression dieses Gens dargestellt.

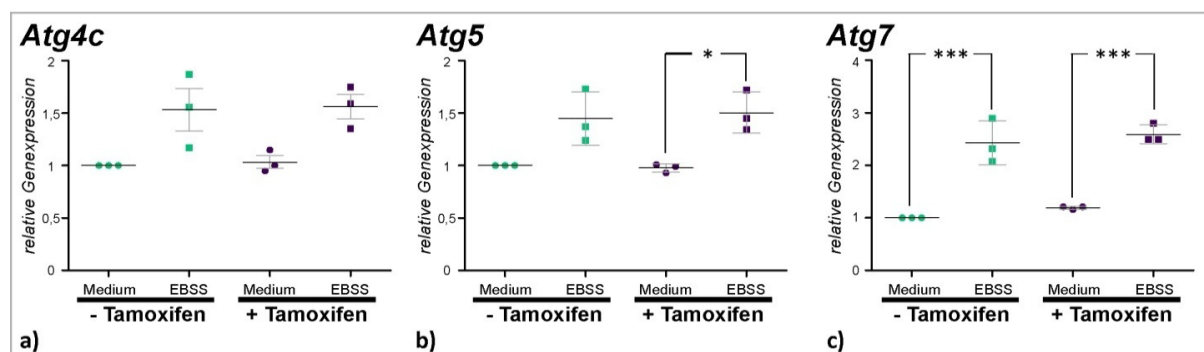


Abbildung 3.2-9: *Atg 4c*-, *Atg 5*- und *Atg 7*-Expression in Δ POZ/Cre-ER-MEFs nach 48-stündiger Behandlung mit Tamoxifen und anschließender Inkubation in EBSS. Δ POZ/Cre-ER-MEFs wurden für 48h in 0,01 μ M Tamoxifen bzw. in einer entsprechenden Menge Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie für 6h in normalem Nährmedium bzw. EBSS inkubiert und danach geerntet. In der Abbildung wurden die Einzelwerte, der Mittelwert, sowie die Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanzen wurden in einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen markiert. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

Bei allen drei untersuchten Genen zeigten sich bei Wachstum der Zellen in normalem Nährmedium keine Expressions-Unterschiede durch die Behandlung mit Tamoxifen. Eine Regulation dieser Gene durch Miz1 scheint unter dieser Bedingung in den Δ POZ/Cre-ER-MEFs nicht gegeben.

Die Expression von *Atg4c* und *Atg5* ließ sich, sowohl in Zellen, die mit, als auch in Zellen, die ohne Tamoxifen behandelt wurden, durch EBSS leicht induzieren (durchschnittliche relative mRNA-Expression jeweils circa 1,5-fach, siehe Abb. 3.2-9 a und b). Auch die Expression von *Atg7* wurde in beiden Bedingungen (+/- Tamoxifen) gleichermaßen induziert, insgesamt aber stärker als die der beiden anderen untersuchten Gene (durchschnittliche relative mRNA-Expression circa 2.5-fach, siehe Abbildung 3.2-9 c). Für alle drei getesteten Gene ergaben sich in keiner der Bedingungen Unterschiede zwischen Zellen, die mit oder ohne Tamoxifen behandelt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression dieser Atg-Gene unter normalen Wachstumsbedingungen und nach Induktion von Autophagie in diesem Zellmodell nicht von Miz1 abhängig ist, dass aber alle drei Gene durch EBSS induziert werden können.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle von Miz1 bei zellulären Reaktionen auf nährstoffarme Bedingungen in HC11-Zellen

Um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Miz1 für den autophagischen Prozess in HC11-Zellen und Δ POZ/Cre-ER-MEFs zu untersuchen, wurden zuerst Genexpressionsanalysen durchgeführt. Es wurde überprüft, ob eine Induktion von Autophagie durch Nährstoffentzug einen Einfluss auf die Expression von *Miz1* sowie verschiedener anderer Gene hat. Um nachvollziehen zu können, ob in den mit EBSS stimulierten Zellen tatsächlich mehr Autophagie abläuft, als bei der Inkubation in normalem Nährmedium, wurde zunächst die Expression einiger Autophagie-abhängiger Gene gemessen. Die Atg-Produkte tragen zu einem reibungslosen Ablauf des autophagischen Prozesses bei und könnten bei stimulierter Autophagie verstärkt exprimiert werden. Hierfür wurde in einem ersten Experiment der zeitliche Verlauf der mRNA-Expression von *Atg9b*, *Atg10* und *Atg5* während einem 24-stündigen Nährstoffentzug mittels qRT-PCR gemessen.

Tatsächlich stieg die Expression von *Atg9b* kontinuierlich an, während die von *Atg10* zunächst für einige Stunden unverändert blieb und dann aber gegen Ende der Inkubationszeit, zwischen 12 und 24 Stunden, ebenfalls zunahm (siehe Abbildung 3.1-4). Die *Atg5*-Expression hingegen blieb unter der Behandlung mit nährstoffarmem Medium während des gesamten Experiments unverändert. Das könnte einerseits daran liegen, dass die Zellen möglicherweise über größere Atg5-Reserven verfügen, die bei plötzlichem Nährstoffentzug den Bedarf an Atg5 für einige Zeit abdecken. In diesem Fall würde die Expression von *Atg5* eventuell erst nach noch längerem Nährstoffentzug (>24 Stunden) induziert werden. Mit diesem Modell wäre auch der verzögerte Anstieg der *Atg10*-Expression erklärbar. Andererseits wäre auch denkbar, dass in den HC11-Zellen verstärkt der alternative, von Atg5 und Atg7 unabhängige autophagische Weg abläuft und deshalb folglich weniger Atg5 gebraucht wird (Nishida et al., 2009).

Die Expressionshöhe von *Miz1* blieb durch die Behandlung mit EBSS zunächst auf ihrem Ausgangsniveau, stieg aber zwischen 12 und 24 Stunden leicht an (siehe Abbildung 3.1-5 und 4.1-1). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor wahrscheinlich eine Rolle bei der Anpassung an nährstoffarme Bedingungen spielt. Allerdings werden durch einen Nährstoffentzug neben der Autophagie auch noch andere Signalwege zur Bereitstellung von Energiereserven, wie z.B. das Ubiquitin-Proteasom-System oder die Chaperon-vermittelte Autophagie, stimuliert (Singh and Cuervo, 2011). Eine Aussage darüber, welcher der induzierten Stoffwechselwege durch Miz1 beeinflusst wird, ist mit Hilfe dieses Experiments leider nicht möglich. Auf Proteinebene ließ sich die

Induktion der Miz1-Expression hingegen weniger gut nachvollziehen. Hier war lediglich ein minimaler Anstieg der Miz1-Expression innerhalb der ersten und nach 24 Stunden nach Zugabe des Hungermediums zu verzeichnen (siehe Abbildung 3.1-13). Um sicher gehen zu können, dass es sich bei dieser Beobachtung nicht um einen zufälligen Unterschied handelt, müsste das Ergebnis in weiteren biologischen Replikaten reproduziert und anschließend mit Hilfe densitometrischer Ausmessung der Banden statistisch ausgewertet werden. Es wäre denkbar, dass eine Induktion der Miz1-Expression bereits unmittelbar nach Stimulierung der Autophagie stattfindet und sich die Expression zum ersten Messzeitpunkt nach einer Stunde bereits wieder normalisiert hat. Um dies zu überprüfen, müssten bei ähnlichem Versuchsaufbau zusätzliche Messzeitpunkte nach weniger als einer Stunde eingeführt werden. Es wäre auch möglich, dass die auf mRNA-Ebene gemessene Zunahme der Genexpression noch nicht genügt, um einen deutlicheren Effekt auf Proteinebene auszulösen. Vielleicht müssten die Zellen aber auch einfach noch länger als 24 Stunden in EBSS inkubiert werden, um eine Zunahme von Miz1 auf Proteinebene beobachten zu können. In kürzlich erschienenen Publikationen wurde eine fehlerhaft ablaufende Autophagie sowohl in Tieren mit einem Miz1 Δ POZ-Domäne-Knockout im Cerebellum als auch in Mäusen mit einem Laktationsdefekt als Folge von fehlendem Miz1 in der Brustdrüse beobachtet (Sanz-Moreno et al., 2014a; Wolf et al., 2013). In diesen Studien wurden verschiedene Zielgene von Miz1, die unter anderem an der Regulation des autophagischen Prozesses beteiligt sind, identifiziert. Möglicherweise reguliert Miz1 diese Gene auch in den HC11-Zellen, wodurch der Anstieg von *Miz1* auf Genexpressionsebene nach Autophagie-Induktion ebenfalls erklärt werden könnte.

Da durch die Autophagie-Stimulation eine positive Regulation der *Miz1*-Expression beobachtet werden konnte, sollte im selben Experiment auch die Expression des Transkriptionsfaktors Myc, eines wichtigen Interaktionspartners von Miz1, untersucht werden. Durch das Zusammenspiel von Miz1 mit Myc wird eine reprimierende Wirkung auf die Genexpression verschiedener Gene erzielt (Herkert and Eilers, 2010). Bei den negativ regulierten Genen handelt es sich unter anderem um Zellzyklusinhibitoren wie p21^{CIP1} oder p15^{INK4b}, aber auch um Zelladhäsionsmoleküle (siehe Abschnitt 1.2.2.2, Gebhardt et al., 2006; Herkert and Eilers, 2010). Die mRNA-Expression von Myc verringerte sich durch Hungern der Zellen innerhalb der ersten Stunde zunächst, ließ sich dann nach dreistündiger Kultivierung der Zellen in Hungermedium aber doch relativ stark induzieren (siehe Abbildung 3.1-6 und 4.1-1). Die Tatsache, dass durch die Zugabe von EBSS zunächst weniger Myc nachgewiesen werden kann, lässt sich anhand bekannter Funktionen des Transkriptionsfaktors mutmaßlich erklären. Eine wesentliche Eigenschaft von Myc besteht in seiner proliferationsfördernden Wirkung (Eilers and Eisenman, 2008). Zur Proliferation von Zellen werden

jedoch Energiequellen benötigt, die unter nährstoffarmen Bedingungen nicht zur Verfügung stehen. Eine Repression von Myc könnte also zu einer Abschwächung der Proliferation und somit zu einer Sicherung von Energiereserven führen, die für das Überleben der Zellen bei Nährstoffentzug gebraucht werden. Nach einer dreistündigen Inkubation der Zellen in EBSS steigt die Expression von Myc jedoch stark an und erreicht nach 24 Stunden einen durchschnittlichen Wert von circa vierfach (im Vergleich zur Kontrolle). Dieser Effekt war zunächst überraschend, da erwartungsgemäß bei einem länger andauernden Nährstoffentzug noch weniger Ressourcen für energieverbrauchende Prozesse zur Verfügung stehen sollten. Diese Beobachtung legt somit die Vermutung nahe, dass dem Transkriptionsfaktor Myc unter nährstoffarmen Bedingungen auch noch andere Aufgaben zukommen. Neben der Regulation von Zellwachstum und Proliferation ist Myc auch an der Regulation des programmierten Zelltods beteiligt (Amati et al., 1993). In verschiedenen Zelllinien führt ein längerer Nährstoffentzug zum Absterben der Zellen durch Induktion von Apoptose (Eisler et al., 2004; Schamberger et al., 2005). Zellen scheinen dabei in Stresssituationen zuerst mit Induktion von Autophagie als Schutzmechanismus zu reagieren. Bei länger anhaltendem zellulären Stress findet dann ein Umschalten von Autophagie zur Apoptose oder autophagischem Zelltod statt (Maiuri et al., 2007). Somit wäre es möglich, dass Myc in HC11-Zellen bei anhaltendem Nährstoffentzug apoptotische Signale vermittelt, die zum Absterben der Zellen führen. Um diese Vermutung zu verifizieren wäre es sinnvoll, einen Apoptose-Assay durchzuführen. In einem weiteren Experiment könnte bei gleichem Versuchsaufbau zum Beispiel eine mögliche DNA-Fragmentierung mit Hilfe eines TUNEL-Assays überprüft werden. Zusätzlich wurde kürzlich auch eine Rolle für den Transkriptionsfaktor Myc in der Autophagie beschrieben (Toh et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Myc das Ausmaß der Autophagie verringert. Myc hemmt dabei die Autophagie durch eine verminderte Phosphorylierung von Jnk1 und Bcl2. Im unphosphorylierten Zustand bindet Bcl2 an Beclin 1, wodurch dieses nicht mehr an der Aktivierung der Autophagie mitwirken kann (Toh et al., 2013). Somit scheint auch Myc für den autophagischen Prozess essentiell zu sein, was die Induktion der Genexpression durch die Behandlung der Zellen mit EBSS ebenfalls erklären würde. Wegen seines onkogenen Potentials unterliegt die Expression von Myc einer sehr strengen Regulierung (Jin and Harper, 2003). Sowohl die mRNA als auch das Myc Protein sind durch einen sehr raschen Umsatz von ca. einer halben Stunde charakterisiert (Jones and Cole, 1987). Aus diesem Grund wäre es interessant zu überprüfen, wie sich die beobachtete Induktion der Myc-mRNA nach Nährstoffentzug auf Proteinebene auswirkt. Dazu könnten zum Beispiel in weiterführenden Experimenten Proteinlysate im gleichen Versuchsaufbau mithilfe eines Westernblots analysiert werden.

Da sowohl die Genexpression von *Miz1* als auch die von *Myc* unter nährstoffarmen Bedingungen induziert wurde, sollte auch *Cdkn1a*, ein gemeinsames Zielgen der beiden Transkriptionsfaktoren, untersucht werden. *Cdkn1a* kodiert für das Protein p21^{CIP1}, bei dem es sich um einen Zellzyklus-Inhibitor handelt. Es bindet an Cyclin-abhängige Kinasen, inhibiert deren Aktivität und verhindert dadurch den Übergang von der G1- in die S-Phase (Harper et al., 1993). Durch das Zusammenwirken der beiden Transkriptionsfaktoren wird die Expression von *Cdkn1a* gehemmt, indem *Myc* die transaktivierende Wirkung von *Miz1* unterdrückt (Herkert and Eilers, 2010; siehe Abschnitt 1.2.2.2). Die verstärkte Bildung von *Miz1* und *Myc* nach sechsständiger Inkubation der Zellen in EBSS könnte zu einer gesteigerten Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren und folglich zu einer verstärkten Inhibierung der *Cdkn1a*-Expression führen.

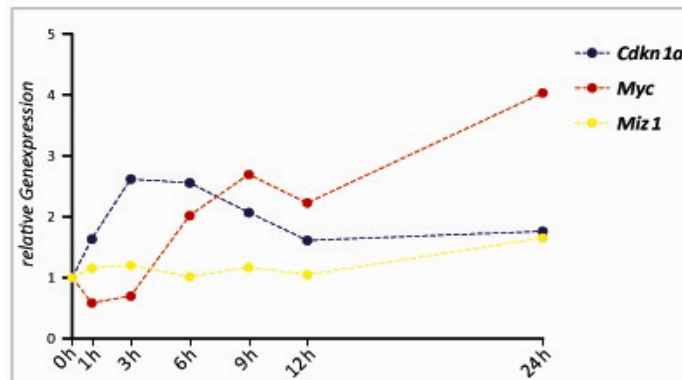


Abbildung 4.1-1: Der zeitliche Verlauf der Genexpression von *Miz1*, *Myc* und *Cdkn1a* nach Induktion von Autophagie. Kombinierte Darstellung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3. HC11-Zellen wurden für 1-24 Stunden in EBSS inkubiert, zu den dargestellten Zeitpunkten geerntet und für die Real Time-PCR aufbereitet. Die Punkte stellen die Mittelwerte der gemessenen Genexpressionen der 3 biologischen Replikate dar. Die Expression von *Miz1* (siehe auch Abb. 3.1-5) wurde in gelb, die von *Myc* (siehe auch Abb. 3.1-6) in rot und die von *Cdkn1a* (siehe auch Abb. 3.1-7) in blau dargestellt.

Die Genexpression von *Cdkn1a* stieg durch den Nährstoffentzug zunächst an und fiel nach circa sechs Stunden tatsächlich wieder leicht ab, erreichte dabei aber nicht mehr den Ausgangswert (siehe Abbildung 3.1-7 und 4.1-1). Die Tatsache, dass die Expression von *Cdkn1a* unter nährstoffarmen Bedingungen erst mal anstieg, lässt sich ähnlich erklären wie die Herunterregulierung von *Myc*. Die Energie, die normalerweise für Proliferation gebraucht wird, wird hier verwendet, um das Überleben der Zellen bei unzureichender Nährstoffversorgung zu sichern. Dies wird vermutlich durch die verminderte *Myc*-Expression und den damit verbundenen Wegfall der hemmenden Wirkung des *Miz1*/*Myc*-Komplex auf p21^{CIP1} unterstützt. Der autophagische Prozess, sowie die Expression von Zellzyklusinhibitoren, scheinen als Antwort auf Nährstoffentzug in etwa gleichzeitig induziert zu werden (Lee et al., 2012). Wie die Autophagie dabei allerdings mit dem Verlauf des Zellzyklus verknüpft ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Lee und Kollegen haben gezeigt, dass

Atg7, neben der Funktion im Atg5/Atg7-Konjugationssystem, auch den Tumorsuppressor p53 bindet und mit diesem gemeinsam unter nährstoffarmen Bedingungen die Expression von *Cdkn1a* stimuliert. Bei Fehlen von Atg7 wird *Cdkn1a* nicht ausreichend induziert und die proapoptotischen Eigenschaften von p53 treten in den Vordergrund (Lee et al., 2012). Dass die Expression von *Cdkn1a* nach sechs Stunden wieder abfällt, ist im Zusammenhang mit der andauernden Hungersituation nur schwer nachvollziehbar, passt aber damit zusammen, dass zu diesem Zeitpunkt die Expression von *Myc* und später auch von *Miz1* ansteigen (siehe Abbildung 3.1-5, 3.1-6 und 4.1-1). Wie erwartet, scheint der Anstieg von *Myc* und *Miz1* eine Inhibition der p21^{CIP1}-Expression zu bewirken. Für den Zellzyklusarrest bei anhaltender Nährstoffarmut sind dann vermutlich andere Zellzyklusinhibitoren (wie zum Beispiel das Retinoblastom-Protein), die nicht durch den *Myc/Miz1*-Komplex reguliert werden, verantwortlich. Um diese Vermutung zu überprüfen, wäre es sinnvoll, die Expression der entsprechenden Gene in diesem Experiment zu messen. Es wäre auch interessant, den zeitlichen Verlauf der p21^{CIP1}-Expression auf Proteinebene darzustellen.

Das Überleben der Zellen durch einen Proliferationsstopp mit entsprechender Einsparung von Energiereserven wird zu Beginn der EBSS-Inkubation also zum einen durch eine Herunterregulierung der mRNA-Expression von *Myc* und zum anderen durch eine Hochregulierung von p21^{CIP1} gesichert. Bei längerfristigem Andauern des Hungerzustands scheinen sich jedoch die Aufgaben der Effektormoleküle und damit das Genexpressionsmuster zu ändern.

Um beurteilen zu können, ob die beobachteten Genexpressionsmuster wirklich auf den Nährstoffentzug zurückzuführen sind und nicht etwa einen Nebeneffekt der Kultivierungsdauer an sich darstellen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dabei wurde die Expression derselben Gene in unbehandelten Zellproben gemessen, die jeweils zur gleichen Zeit wie die EBSS-Proben geerntet wurden. Da sich die unbehandelten HC11-Zellen durch ein reges Wachstum auszeichnen (siehe Abbildung 3.1-8), wurden sie in diesem Experiment weniger dicht ausgesät, als im Vorherigen (circa 40-50% konfluent).

Die Expression der meisten der getesteten Gene zeigte sich in diesem Versuch leicht verändert. Hier reagierten die Zellen bezüglich der Expression einiger Gene sensitiver auf die Behandlung mit EBSS, als die konfluenteren Zellen vom vorherigen Experiment. So stieg die Expression von *Atg9b* und *Atg10* in diesem Experiment nach sechs Stunden stärker an, als im vorhergehenden Experiment (siehe Abbildung 3.1-9). Allerdings fiel deren Expression nach 24 Stunden wieder ab. Auch die Genexpression von *Miz1* wurde in den weniger konfluenten Zellen durch den Nährstoffentzug schneller und stärker induziert als in den dichter gewachsenen Zellen, in denen ein Anstieg der Genexpression erst nach 24 Stunden zu verzeichnen war (siehe Abbildung 3.1-10). Nach sechs

Stunden verdoppelte sich hier die Genexpression von *Miz1* im Vergleich zu den Kontrollzellen und fiel nach 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert ab. Dieses Ergebnis deckt sich mit Resultaten aus früheren Diplom- und Doktorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen eine *Miz1*-Induktion durch einen sechsständigen Aminosäure-Entzug in MEFs und AR4-2J-Zellen beschrieben wurde (Berliner, 2011; Webert, 2011; Oppenheimer, 2009). Diese Beobachtungen verstärken den Verdacht, dass *Miz1* eine Rolle in der Anpassung der Zellen an nährstoffarme Bedingungen spielt. Dabei scheint die Genregulation durch *Miz1* bei weniger konfluenten Ausgangsbedingungen vergleichsweise stärker ausgeprägt zu sein.

Die Expression des Transkriptionsfaktors *Myc* zeigte ähnliche Tendenzen. Hier war nach sechs Stunden bereits eine höhere Genexpression zu verzeichnen, als in den konfluenten Zellen des ersten Experiments nach 24 Stunden (siehe Abbildungen 3.1-6, 3.1-11, 4.1-1 und 4.1-2). Im Unterschied zur *Miz1*-Expression fiel sie aber nicht wieder auf die Ausgangswerte zurück, sondern stieg in einem Versuch noch weiter an und fiel im zweiten Versuch leicht ab (siehe Abbildung 3.1-11). Ob auch hier eine Repression von *Myc* unmittelbar nach Autophagie-Induktion stattfindet, ist aus diesem Experiment nicht ersichtlich, da keine Proben zu früheren Zeitpunkten geerntet wurden. In früheren Experimenten dieser Arbeitsgruppe wurden je nach Zelltyp verschiedene Reaktionen der *Myc*-Expression auf eine Inkubation in EBSS beobachtet. In AR4-2J-Zellen wurde die Genexpression von *Myc* nach 6-stündigen Nährstoffentzug ebenfalls induziert (Webert, 2011). MEFs zeigten unter diesen Bedingungen hingegen eine Herunterregulierung der *Myc*-Expression (Berliner, 2011). Auch in A31-Zellen wurde bei Inkubation in Serum-freien Medium bereits nach 45 Minuten ein Rückgang der *Myc*-Genexpression beobachtet (Dean et al., 1986).

Die Expression von *Cdkn1a* zeigte sich im Vergleich zum Vorexperiment unverändert. Im Vergleich zu Kontrollzellen war auch hier die Genexpression nach sechs Stunden erhöht und fiel zwischen sechs und 24 Stunden wieder leicht ab (siehe Abbildungen 3.1-7, 3.1-12, 4.1-1 und 4.1-2). Die Expression von *Cdkn1a* scheint also durch die Dichte der Zellen unbeeinflusst zu bleiben. Auch hier wäre eine Regulation von $p21^{CIP1}$ durch *Miz1* und *Myc* denkbar, da *Myc*-Level zwischen sechs und 24 Stunden ansteigen, während die von *Cdkn1a* sinken. Warum allerdings auch die Expression von *Miz1* in diesem Zeitraum abfällt und wie sich das auf die Hemmung von $p21^{CIP1}$ auswirkt, ist unklar. Es könnte sein, dass die Bindung zwischen *Miz1* und *Myc*, die für eine suffiziente Inhibierung von $p21^{CIP1}$ notwendig ist, durch die Behandlung mit EBSS beeinträchtigt ist und die Expression von *Myc* im Sinne einer negativen Feedback-Schleife induziert wird.

Dass eine Zunahme der Zelldichte Unterschiede im Genexpressionsmuster bewirkt, wurde schon in früheren Arbeiten in verschiedenen Zelllinien beobachtet (Altiock and Groner, 1998; Lai and Pittelkow,

2004; Poumay and Pittelkow, 1995). Bei den HC11-Zellen handelt es sich um eine epitheliale Brustdrüsen-Zelllinie, die durch die Zugabe verschiedener Faktoren (siehe Abschnitt 3.1.1; Ball et al., 1988) zur Differenzierung und Laktation angeregt werden kann. Eine Voraussetzung für die Induktion der Milchproteinproduktion sind Interaktionen der Zellen untereinander, die nur bei vollständiger Konfluenz der Zellen gewährleistet ist (Altiok and Groner, 1998). Möglicherweise beeinflusst die Zelldichte auch die Expression von *Miz1*, *Myc*, *Atg9b* und *Atg10* unter nährstoffarmen Bedingungen, wodurch die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Experimente erklärt werden könnten.

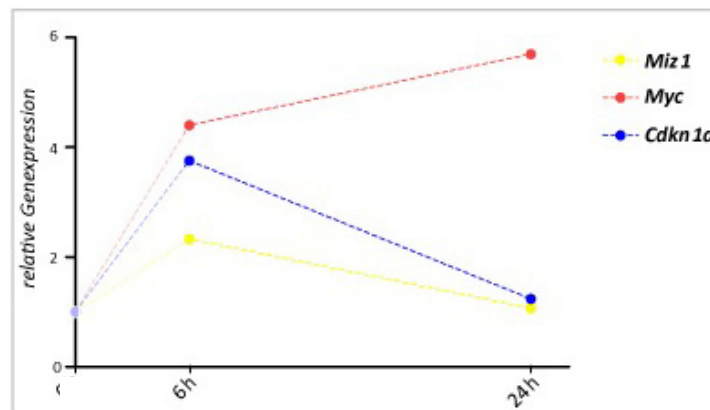


Abbildung 4.1-2: Der zeitliche Verlauf der Genexpression von *Miz1*, *Myc* und *Cdkn1a* nach Induktion von Autophagie in weniger dicht gewachsenen HC11-Zellen. Kombinierte Darstellung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3. HC11-Zellen wurden für 6 und 24 Stunden in Vollmedium bzw. EBSS inkubiert, zu den beiden Zeitpunkten geerntet und für die Real Time-PCR aufbereitet. Die Punkte stellen die Mittelwerte der gemessenen Genexpressionen der 2 biologischen Replikate dar. Die Expression von *Miz1* (siehe auch Abb. 3.1-10) wurde in gelb, die von *Myc* (siehe auch Abb. 3.1-11) in rot und die von *Cdkn1a* (siehe auch Abb. 3.1-12) in blau dargestellt.

Bei den in Vollmedium gewachsenen Zellen fiel auf, dass sowohl die mRNA-Expression von *Myc*, als auch von *Atg10* zwischen sechs und 24 Stunden leicht angestiegen war (siehe Abbildung 3.1-9b und 3.1-11), während die Expressionshöhe der übrigen gemessenen Gene unverändert blieb (siehe Abbildung 3.1-9a, 3.1-10 und 3.1-12). Die Zunahme der *Myc*-Expression liegt vermutlich am wachstumsfördernden Effekt des Transkriptionsfaktors auf proliferierende Zellen. Nach Erreichen der Konfluenz sollte diese wieder abnehmen (Dean et al., 1986; Grolli et al., 1997). Warum die Expression von *Atg10* zunimmt, ist unklar. *Atg10* wirkt, wie in Abschnitt 1.1.1.5 beschrieben, als konjugierendes Enzym (E2) in einer der Ubiquitin-ähnlichen Reaktionen. Es vermittelt die Bindung von *Atg12* an *Atg5* und trägt somit zur Elongation der Isolationsmembran bei (Yamaguchi et al., 2012). In verschiedenen Krebszelllinien führte eine Hochregulierung von *Atg10* zur Proliferationshemmung (Cho et al., 2013). Funktionen von *Atg10* im Rahmen des Zellzyklus in normalen Zellen wurden bisweilen nicht beschrieben. Es wäre denkbar, dass *Atg10* in dicht gewachsenen Zellen einen Wachstumsstopp bewirkt. Ob die gemessenen Veränderungen dieser beiden Gene durch die Zunahme der Zelldichte

oder aber durch die Kultivierungsdauer zustande kommen, konnte in diesem Experiment nicht festgestellt werden. Möglicherweise hat sich die Genexpression der Zellen unter Wachstumsbedingungen auch schon im Zeitraum zwischen 0 und 6 Stunden verändert. Um das zu überprüfen, wäre eine Probenentnahme zu Beginn des Experiments nötig gewesen. Falls sich die Genexpression in diesem Zeitraum tatsächlich verändert, hätte eine solche Zellprobe als Bezugsprobe für die Berechnung der relativen mRNA-Expression zu anderen Werten geführt. Aus diesem Grund wurde in Abbildung 4.1-2 der Verlauf der Genexpression in den ersten 6 Stunden mit abgeschwächter Farbinsintensität dargestellt. Um die Ergebnisse mit statistischen Auswertungen zu untermauern, müsste der Versuch noch mindestens ein drittes Mal wiederholt werden.

4.2 Autophagie in HC11-Zellen in Abhängigkeit von Miz1 und Myc, sowie deren Interaktion

Für weitere Untersuchungen des autophagischen Prozesses in Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktoren Miz1 und Myc, wurden HC11-Zellen mit unterschiedlichen Vektorkonstrukten (pBABE-puro- \emptyset , pBABE-puro-Miz1, pBABE-puro-Myc, pBABE-puro-MycV394D, pBABE-puro-ShScr und pBABE-puro-shMiz1) infiziert (siehe Abschnitt 3.1.5). Zur Stimulierung der Autophagie in diesen Zelllinien wurde genau wie bei den oben bereits diskutierten Experimenten EBSS verwendet. Da die autophagische Aktivität einer Zelle immer sowohl durch die Syntheserate neuer Autophagosomen, als auch von deren Abbaugeschwindigkeit bestimmt wird (Klionsky et al., 2008b), kamen bei diesem Experiment zusätzlich lysosomale Inhibitoren zum Einsatz. Durch die Verwendung dieser Inhibitoren sollte der autophagische Flux in den Zellen unterbrochen werden, wodurch eine Kompensation einer möglicherweise gesteigerten Autophagosomen-Syntheserate durch einen ebenfalls vermehrten Abbau dieser nicht mehr stattfinden kann. Infolgedessen akkumulierten die Autophagosomen und konnten anschließend mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen untersucht werden. Zur Darstellung von Autophagosomen und Autolysosomen wurde LC3 angefärbt. Unterschiede bezüglich ihrer autophagischen Aktivität, welche durch die Quantifizierung der angefärbten Autophago- bzw. Autolysosomen ermittelt wurden, sind für die unterschiedlichen Zelllinien in Tabelle 4.1 noch einmal zusammengefasst.

Obwohl die durch Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelte Anzahl der LC3-Punkte generell die Anzahl der Autophagosomen recht genau widerspiegelt, bringt die Quantifizierung der Punkte dennoch einige technische Probleme mit sich, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollten (Mizushima et al., 2010b). So werden zum Beispiel bei der konventionellen (nicht

konfokalen) Fluoreszenzmikroskopie die Signale der gesamten Zelle in einem einzigen Bild erfasst. Da die Autophagosomen aber in verschiedenen Tiefenebenen der Zellen verteilt sind, kann es bei dieser Technik zur Überlagerung von LC3-Punkten kommen. Diese könnten dann fälschlicherweise als nur ein Autophagosom bzw. bei Überlagerung durch den Zellkern gar nicht gewertet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass neben exogenem, durch Transfektion überexprimiertem LC3 auch endogenes LC3 eine erhöhte Neigung zur Aggregation aufweist (Kuma et al., 2007). Da sich solche Aggregate ebenfalls als leuchtende runde Punkte darstellen, könnten sie versehentlich für Autophagosomen gehalten werden und somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die in diesem Experiment gefundenen Unterschiede zusätzlich mittels Elektronenmikroskopie überprüft.

	Medium	Medium + Inhibitor	EBSS	EBSS + Inhibitor
ShScr	3.85	4.43	6.3	7.28
ShMiz1	4.3	4.91	6.91	7.74
pBABE-puro	3.79	4.75	6.82	7.73
Miz1\uparrow	5.05	5.47	8.01	8.81
Myc\uparrow	5.64	6.83	10.65	16.22
MycVD\uparrow	3.69	4.65	6.96	9.24

Tabelle 4.1: Übersicht zur autophagischen Aktivität in den verschiedenen Zelllinien. Die mit den dargestellten Konstrukten infizierten HC11-Zellen wurden für 6h entweder in Vollmedium oder in EBSS, jeweils mit oder ohne lysosomale Inhibitoren, inkubiert. Die Zahlenwerte beschreiben die durchschnittliche Anzahl von Autophagosomen pro Zelle.

HC11-Zellen, die Miz1 überexprimierten, zeigten in diesem Experiment in allen Bedingungen eine leicht erhöhte autophagische Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen, wohingegen in Zellen mit herunterreguliertem Miz1 keine Unterschiede bezüglich der Kontrolle gefunden werden konnten (siehe Tabelle 4.1 und Abbildungen 3.1-17 - 3.1-24). Die leichte Hochregulierung der Autophagie in den Miz1-überexprimierenden Zellen spricht, zusätzlich zu den oben bereits diskutierten Ergebnissen (siehe Abschnitt 4.1), für eine Beteiligung von Miz1 an der Regulierung der Autophagie. Wenn eine Überexpression von Miz1 zu einer verstärkt ablaufenden Autophagie führt, liegt die Vermutung nahe, dass eine Repression von Miz1 umgekehrt zu einer Inhibierung des Prozesses führen könnte. Im Einklang mit dieser Hypothese steht die bereits erwähnte Publikation von Wolf und Kollegen, die eine fehlerhaft ablaufende Autophagie durch eine Herunterregulierung von Miz1 im Kleinhirn von Mäusen beschreibt (Wolf et al., 2013). Auch in der Brustdrüse von laktierenden Mäusen mit Miz1 Δ POZ-Domäne Knockout konnte eine

Herunterregulierung Autophagie-assoziiertes Gene gezeigt werden (Sanz-Moreno et al., 2014). Dass dieses Ergebnis in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnte, könnte eventuell an einem unzureichenden Knockdown von Miz1 durch die verwendeten Vektoren liegen (siehe Abschnitt 3.1.5.1 - 3.1.5.2), aber auch daran, dass hier mit einer Brustdrüsen-Zelllinie (also nicht mit primären Zellen) gearbeitet wurde.

Deutlichere Unterschiede zeigten Zellen, die Myc überexprimierten. Diese Zellen zeichneten sich im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zelllinien in allen Bedingungen durch eine erhöhte autophagische Aktivität aus (siehe Tabelle 4.1 und Abbildungen 3.1-17 - 3.1-24). Besonders klar zeigte sich dieser Unterschied unter nährstoffarmen Bedingungen bei Einsatz von lysosomalen Inhibitoren. Wie oben bereits besprochen, konnte in einer früheren Publikation gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von Myc zu einer verstärkten Interaktion zwischen Bcl2 und Beclin1 und damit zu einer fehlerhaft ablaufenden Autophagosomenbildung führt (Toh et al., 2013). Im Umkehrschluss wäre bei einer Überexpression von Myc eine Reduzierung des hemmenden Einflusses von Bcl2 und folglich eine Zunahme der autophagischen Aktivität denkbar.

Interessanterweise fanden sich in Zellen, die die Myc-Mutante V394D exprimierten, ähnlich viele Autophagosomen wie in den entsprechenden Kontrollzellen (siehe Tabelle 4.1 und Abbildungen 3.1-17 - 3.1-24). Lediglich bei Inkubation mit EBSS und Einsatz lysosomaler Inhibitoren zeigten sie eine leicht erhöhte autophagische Aktivität, die jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war als in den Wildtyp-Myc-Zellen. Diese durch die Fluoreszenzmikroskopie ermittelten Unterschiede zwischen den Myc- und den MycVD-überexprimierenden Zellen konnten anschließend mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen überprüft und bestätigt werden (siehe Abbildungen 3.1-25 - 3.1-26). Auch hier zeigten sich bei Behandlung mit EBSS und lysosomalen Inhibitoren mehr Autophagosomen in den Zellen, die Myc überexprimierten. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor Myc für die Regulation der Autophagie zwar sehr wichtig ist, dabei jedoch zusätzlich seine Interaktion mit Miz1 eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Die gesteigerte autophagische Aktivität von Zellen, die Myc überexprimieren im Vergleich zu Zellen, die mit der MycVD-Mutante infiziert wurden, kann verschiedene Ursachen haben. Zu den bekannten Aufgaben des Transkriptionsfaktors Myc gehört die Stimulation von Zellwachstum und Proliferation (Dai and Lu, 2008). Grundlage für das Zellwachstum ist eine Zunahme der Zellmasse, welche wiederum von der Synthese neuer Proteine und anderer Makromoleküle abhängt (Gomez-Roman et al., 2003; Schuhmacher et al., 1999). Myc reguliert die Ribosomen-Biosynthese und die Translation von Proteinen, indem es die Transkription verschiedener Gene induziert, die für diese Prozesse essentiell sind (Dai and Lu, 2008). Dazu gehören beispielsweise die Gene der drei RNA-Polymerasen,

sowie eine Vielzahl ribosomaler Proteine (z.B. Nucleolar protein 56, Block of proliferation 1, Fibrillarin, Nucleolin, Nucleophosmin). Weiterhin fördert Myc die mRNA-Translation durch Genregulation von Transkriptions-Initiationsfaktoren (z.B. eIF4F, eIF2a, eIF4A1, eIF4G1) (Dai and Lu, 2008; van Riggelen et al., 2010). Ein verstärkter Umsatz von Proteinen bei raschem Wachstum führt zu einem vermehrten Anfall von Abfallprodukten, von denen die Zelle gereinigt werden muss, zum anderen herrscht unter solchen Bedingungen, ähnlich wie in Tumorzellen, ein sehr hoher Energiebedarf (Yang et al., 2011). Eine gesteigerte autophagische Aktivität könnte bei Überexpression von Myc also sowohl zur Reinigung der Zellen, als auch zur Bereitstellung von Energieresourcen beitragen. In diesem Fall würde der Transkriptionsfaktor die Autophagie nicht direkt regulieren, sondern diese als Konsequenz einer gesteigerten Proteinbiosynthese indirekt stimulieren. Es wäre möglich, dass die Regulation dieser Prozesse durch die fehlende Interaktion zwischen Miz1 und Myc in den Zellen, die die Mutante MycVD überexprimieren, nicht im selben Ausmaß stattfindet. Ein vermindertes Zellwachstum und eine verringerte Proliferationsrate könnten in diesen Zellen also einen geringeren Bedarf an autophagischer Aktivität erklären. Das Proliferationsverhalten von MycV394D- im Vergleich zu Wildtyp-Myc-überexprimierenden Zellen wurde in früheren Veröffentlichungen unterschiedlich beschrieben. Herold und Kollegen beschreiben einen nur geringfügig stärker stimulierenden Effekt von Wildtyp-Myc im Vergleich zur Mutante MycVD auf die Proliferation von infizierten Rat1-Zellen, welcher allerdings mit Hilfe einer BrdU-Färbung nicht bestätigt werden konnte (Herold et al., 2002). Auch eine Überexpression der beiden Myc-Vektoren in neuronalen Progenitorzellen führte zu einem gleichartigen Proliferationsverhalten (Kerosuo et al., 2008). Lymphomzellen, die retroviral mit einem MycV394D-Konstrukt infiziert wurden, zeigten eine eingeschränkte Zellproliferation im Vergleich zu Zellen, die mit Wildtyp-Myc infiziert waren (Riggelen et al., 2010). Experimente unserer Arbeitsgruppe (A. Sanz-Moreno, nicht veröffentlicht) zeigten, dass HC11-Zellen, die MycVD überexprimieren, im Vergleich zu Zellen, die WT-Myc überexprimieren, weniger stark proliferieren. Ein Hinweis auf eine möglicherweise gesteigerte Proteinbiosynthese zeigte sich in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der beiden Zelltypen, in denen Myc-Zellen durch ein ER mit dilatierten Zisternen aufgefallen waren (siehe Abbildung 3.1-25 c+d).

Ferner könnte es auch sein, dass die gefundenen Differenzen in den Zellen mit den verschiedenen Myc-Konstrukten auf eine ungleiche Autophagosomen-Abbauraten zurückzuführen sind. Möglicherweise werden die Autophagosomen in Wildtyp-Myc-Zellen vergleichsweise langsamer abgebaut und reichern sich demzufolge an. Zur Überprüfung dieser Hypothese ist es hilfreich, die ermittelten Autophagosomen-Anzahlen innerhalb einer Zelllinie unter nährstoffarmen Bedingungen jeweils mit und ohne Autophagie-Inhibitoren zu vergleichen. Wäre der lysosomale Abbau in einer der

beiden Zelllinien generell beeinträchtigt, würde der Einsatz lysosomaler Inhibitoren wahrscheinlich zu keiner bedeutenden zusätzlichen Anreicherung von Autophagosomen führen. Der zahlenmäßige Unterschied zwischen stimulierten Zellen, die mit bzw. ohne die Inhibitoren behandelt wurden, müsste also kleiner sein, als in Zellen mit regulärer Autophagosomen-Abbaurrate. Hier zeigte sich nach Induktion der Autophagie ein Unterschied von 5,57 LC3-Punkten (52,3%ige Zunahme von LC3-Punkten in der Kondition EBSS + Inhibitoren im Vergleich zu EBSS allein; siehe Tabelle 4.1) in Wildtyp-Myc-Zellen in Abhängigkeit von den lysosomalen Inhibitoren. In Zellen, die mit der Myc-Mutante V394D infiziert waren, stieg die Anzahl der Autophagosomen nach Einsatz lysosomaler Inhibitoren jedoch durchschnittlich nur um 2,28 Punkte pro Zelle (32,76%ige Zunahme von LC3-Punkten in der Kondition EBSS + Inhibitoren im Vergleich zu EBSS allein; siehe Tabelle 4.1) und damit sogar weniger als in den Wildtyp-Myc-Zellen an (siehe Tabelle 4.1). Diese Beobachtungen machen eine verminderte lysosomale Abbaurrate als Ursache für die Autophagosomenanreicherung in den Wildtyp-Myc-Zellen eher unwahrscheinlich, sollten aber in weiteren Experimenten durch Anwendung anderer Methoden (z.B. einer LAMP 1-Färbung) überprüft werden.

Zuletzt wäre auch denkbar, dass die Interaktion zwischen Miz1 und Myc bei der Regulation des autophagischen Prozesses selbst eine Rolle spielt. Durch den Wegfall dieser Interaktion in der Myc-Mutante V394D könnte eventuell die verminderte autophagische Aktivität im Vergleich zu den mit Wildtyp-Myc infizierten Zellen erklärt werden. Eine Regulierung der Autophagie durch die beiden Transkriptionsfaktoren auf Genexpressionsebene wäre möglich. Wie in Kapitel 1.2.2.1 bereits ausführlich beschrieben, werden verschiedene Gene durch Miz1 transaktiviert. Durch eine Bindung von Myc an Miz1 kommt es jedoch zur Repression derselben Gene (Herkert and Eilers, 2010). Mittels High-Throughput-Screening konnten in Mausfibroblasten 541 Gene identifiziert werden, deren Expression auf diese Weise reguliert werden (Walz et al., 2014). Ob dieser Regulationsmechanismus auch für die Autophagie von Bedeutung ist, sollte nun mit Hilfe von Genexpressionsanalysen untersucht werden. Dazu wurden, wie bei der mikroskopischen Analyse, HC11-Zellen, die entweder Myc oder MycV394D überexprimierten, verwendet und mit EBSS stimuliert. Bei den untersuchten Genen handelt es sich um *Atg3*, *Atg4a*, *Atg4c*, *Atg5* und *Atg12*. Die entsprechenden Proteine sind, wie in Kapitel 1.1.1.5 beschrieben, an der Elongation der Phagophore beteiligt. Bei *Atg4a* und *4c* handelt es sich um Homologe von *Atg4*, welches an der Prozessierung von LC3 beteiligt ist. Bei Säugern kommen insgesamt vier *Atg4*-Homologe vor (*Atg4a*, *Atg4b*, *Atg4c* und *Atg4d*), die sich durch eine unterschiedliche Spezifität bezüglich ihrer Substrate, den *Atg8*-Homologen (u.a. LC3) auszeichnen. Für das in dieser Arbeit gemessene *Atg4a* scheinen die *Atg8*-Homologe GABARAP und GATE16 die besten Substrate zu sein, während *Atg4c* durch eine sehr schwache Substratspezifität

bezüglich aller Atg8-Homologe charakterisiert ist (Li et al., 2011). Außerdem wurden einige der von Wolf und Sanz-Moreno und Kollegen beschriebenen Gene, die von Miz1-abhängig exprimiert werden und an der Regulierung des autophagischen Prozesses beteiligt sind, untersucht. Es handelte sich um *Exoc2*, *Vamp4*, *Pikfyve*, *Spast* und *Ambra1*. Eine Übersicht der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen ist in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Obwohl sich bei der immunhistochemischen Färbung von LC3 zwischen den Myc- und MycVD-überexprimierenden Zellen bereits ohne Stimulierung der Autophagie unterschiedliche Tendenzen bezüglich ihrer autophagischen Aktivität zeigten, konnte auf Genexpressionsebene kein nennenswerter Einfluss der beiden Vektoren auf die hier untersuchten Gene gefunden werden (siehe Tabelle 4.2).

	Vollmedium		Hungermedium (EBSS)	
	Myc	MycVD	Myc	MycVD
Atg 3	(1)	↔ (0.96)	↔ (1.11)	↔ (1.45)
Atg 4a	(1)	↔ (1.06)	↔ (0.97)	↑↑ (1.83)
Atg 4c	(1)	↔ (0.9)	↔ (1.02)	↔ (0.99)
Atg 5	(1)	↔ (1.08)	↔ (0.93)	↑ (1.49)
Atg 12	(1)	↔ (1.19)	↑↑ (2.08)	↑↑ (4.2)
Ambra 1	(1)	↔ (1.16)	↔ (1.11)	↑ (1.63)
Exoc 2	(1)	↔ (1.03)	↔ (0.91)	↔ (0.92)
Pikfyve	(1)	↔ (1.16)	↔ (1.02)	↔ (1.29)
Vamp 4	(1)	↔ (0.9)	↔ (0.87)	↔ (0.84)
Spast	(1)	↔ (1.05)	↔ (1.12)	↑ (1.7)

Tabelle 4.2: Übersicht über die gemessenen Genexpressionen in Zellen, die Myc oder MycVD überexprimierten. Die mit den jeweiligen Konstrukten infizierten HC11-Zellen wurden für 6h in Vollmedium oder EBSS inkubiert. Die für die jeweiligen Gene gemessene relative Genexpression bezieht sich auf Zellen, die Myc überexprimierten und in Vollmedium inkubiert wurden. Bei den in Klammern dargestellten Zahlenwerten handelt es sich um den Mittelwert der relativen Genexpression aus 3 unabhängigen Experimenten. Unterschiede wurden folgendermaßen dargestellt: ↔ = kein Unterschied, ↑ = leicht erhöhte Expression (rel. Genexpression > 1.49), ↑↑ = erhöhte Genexpression (rel. Genexpression >1,8), statistisch signifikante Unterschiede wurden dunkelrot markiert.

Da in diesem Experiment aber nicht alle an der Autophagie beteiligten Gene untersucht wurden, wäre es möglich, dass andere Gene durch die Expression der beiden Myc-Vektoren unterschiedlich reguliert werden. Deutlichere Unterschiede hinsichtlich ihrer Genexpression zeigten sich hingegen

nach Induktion der Autophagie durch EBSS. Während in den MycVD-überexprimierenden Zellen, ähnlich wie in den Kontrollzellen (siehe Tabelle 4.2 und Abschnitt 3.1.7.1 - 3.1.7.2), die Expression einiger Gene (*Atg4a*, *Atg5*, und *Atg12*, *Ambra1* und *Spast*) durch die Inkubation mit EBSS stimuliert wurde, veränderte sich die Expression derselben Gene in den Wildtyp- Myc-Zellen kaum (siehe Tabelle 4.2 und Abschnitt 3.1.7.1 - 3.1.7.2).

Dass *Atg5*, *Atg12* und *Spast* in den Zellen mit mutiertem Myc unter nährstoffarmen Bedingungen signifikant stärker exprimiert wurden als in den Wildtyp-Myc-Zellen, überraschte in der Zusammenschau mit den morphologischen Befunden zunächst. Bei diesen war im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine geringere autophagische Aktivität nach Inkubation mit EBSS aufgefallen, weshalb auch ein niedrigerer Bedarf an Nachschub von Atg-Proteinen und demzufolge eine schwächere Transkription der entsprechenden Gene gut vorstellbar gewesen wäre. Vermutlich hemmt Miz1 durch seine Interaktion mit Myc die Expression dieser drei Gene, während in der Mutante MycV394D dieser drosselnde Effekt wegfällt. Dieser regulatorische Mechanismus wurde, wie oben schon erwähnt, für andere Gene (zum Beispiel *Cdkn1a*) bereits beschriebenen (Herkert and Eilers, 2010). In Brustdrüsengewebe wurden *Spast* und *Ambra1* bereits als direkte Zielgene von Miz1 beschrieben (Sanz-Moreno et al., 2014). Auch *Atg5* wurde in HeLa-Zellen sowohl von Miz1 als auch von Myc gebunden, was den von Herkert und Eilers beschriebenen regulatorischen Mechanismus gut vorstellbar macht (Walz et al., 2014). Inwiefern diese Gene auch in HC11 direkte Zielgene für Miz1 und Myc darstellen bzw. ob auch *Atg12* von Miz1 direkt gebunden wird, müsste in weiteren Experimenten zum Beispiel mittels Chromatin-Immunopräzipitation untersucht werden.

Möglicherweise handelt es sich bei der gesteigerten Genexpression von *Atg5*, *Atg12* und *Spast* aber auch um einen Anpassungsmechanismus an den Wegfall der Interaktionsfähigkeit zwischen Miz1 und Myc. Als Reaktion auf eine eventuell fehlerhaft ablaufende Autophagie in den MycVD-überexprimierenden Zellen, wäre denkbar, dass *Atg5*, *Atg12* und *Spast*, aber möglicherweise auch andere, hier nicht untersuchte Autophagie-assoziierte Proteine, kompensatorisch vermehrt gebildet werden. Generell sollte bei der Beurteilung dieser Beobachtungen bedacht werden, dass es sich um eine Überexpression einer von exogen zugeführten Myc- bzw. MycVD-Sequenz handelt. In den mit der Myc-Mutante infizierten Zellen kommt also neben dem künstlich induzierten, bindungsdefizienten Myc auch noch das endogene Myc vor, welches normal mit Miz1 interagieren und somit eventuell zu einem regulären Ablauf der Autophagie beitragen kann. Um diesen Effekt vollständig zu unterbinden, müsste ein MycVD-KnockIn-Modell verwendet werden. Außerdem ist zu beachten, dass es sich um eine Überexpression humaner Myc-Sequenzen in Maus-Zellen handelt. Es

wäre denkbar, dass sich das humane Myc von murinem Myc leicht unterscheidet und in den Maus-Zellen eine leicht veränderte Wirkung im Vergleich zum endogenen Myc entfaltet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde leider nicht untersucht, ob *Bcl2* durch die beiden Myc-Varianten nach Induktion der Autophagie unterschiedlich stark exprimiert wird. Patel und McMahon konnten zeigen, dass Miz1 die Expression von *Bcl2* positiv reguliert, während sie in Anwesenheit von Myc gehemmt wird (Möröy et al., 2011; Patel and McMahon, 2007b). Eine verstärkte Expression von *Bcl2* durch die Überexpression der Mutante MycV394D könnte in den entsprechenden Zellen eine vermehrte Bindung an Beclin 1 zur Folge haben, wodurch die Autophagie gehemmt würde.

Neben der Regulation der Autophagie auf Genexpressionsebene, wäre auch eine Beeinflussung der Autophagie-Maschinerie im Zytoplasma denkbar. Peukert und Kollegen konnten zeigen, dass Miz1 auch im Zytoplasma vorkommt und vermuteten, dass es durch Bindung an Myc, welches im Unterschied zu Miz1 die notwendige Kernlokalisierungssequenz aufweist, in den Kern gelangt (Peukert et al., 1997; siehe Abschnitt 1.2.2.3). Da Miz1 in der Myc-Mutante V394D nicht an Myc binden kann, könnte möglicherweise der Transport von Miz1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern reduziert sein und folglich zu einer erhöhten Aktivität von Miz1 im Zytoplasma führen. Bei einer der beschriebenen Funktionen von Miz1 im Zytoplasma handelt es sich um die Hemmung der TNF α -induzierten Jnk-Aktivierung (Liu et al., 2009). Im inaktiven Zustand ist Jnk nicht in der Lage, Bcl 2 durch Phosphorylierung zu hemmen. Dadurch kann Bcl 2 an Beclin1 binden und die Autophagie negativ regulieren (Toh et al., 2013), womit die abgeschwächte autophagische Aktivität in den MycVD-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ebenfalls erklärt werden könnte. Ein stimulierender Einfluss von TNF α auf den autophagischen Prozess wurde bereits für verschiedene Zelltypen beschrieben (Cha et al., 2013; Jia et al., 2006; Lin et al., 2013). Ob TNF α auch in HC11-Zellen exprimiert wird und somit als Regulatormolekül der Autophagie in Frage kommt, könnte in weiteren Experimenten z.B. durch Genexpressionsanalysen ermittelt werden.

Es wäre weiterhin interessant gewesen, das Experiment auf die Messung weiterer für die Autophagie relevante Genen auszudehnen, sowie die Expression der verschiedenen Gene unter dem Einfluss der lysosomalen Inhibitoren zu messen.

4.3 Untersuchung der Autophagie in embryonalen Mausfibroblasten mit induzierbarem Miz1/ Δ POZ-Domäne-Knockout

In verschiedenen früheren Arbeiten unserer Gruppe wurde bereits ein möglicher Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf die Autophagie untersucht. Hierzu wurden embryonale

Mausfibroblasten verwendet, die zuvor aus Miz1/POZ-Domäne-Knockout Mäusen isoliert worden waren. Als Kontrolle für diese Untersuchungen diente eine weitere MEF-Zelllinie, in der die POZ-Domäne des *Miz1*-Gens nicht deletiert war. In diesen Experimenten war aufgefallen, dass Zellen ohne funktionelles Miz1 empfindlicher auf Nährstoffentzug reagierten und eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen aufwiesen (Oppenheimer, 2009). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Miz1 die Expression einiger Autophagie-abhängiger Gene sowohl in nährstoffarmer als auch in nährstoffreicher Umgebung beeinflusst. Während basaler Autophagie zeigte sich eine Miz1-abhängige Genexpression von *Atg9b*, *Atg16/2*, *Atg4c*, *Atg5* und *Atg7* (Berliner, 2011; Oppenheimer, 2009; Müller 2008). Nach sechsständiger Inkubation der Zellen in EBSS wurden für *Atg9b* und *Atg7* unterschiedliche Expressionen in Relation zu Kontrollzellen gemessen, während sich die Expression von *Atg4c* und *Atg5* durch EBSS in beiden Zelllinien nicht induzieren ließ (Oppenheimer, 2009). Ob die beobachteten Genexpressionsunterschiede in diesen Zellen einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese haben, wurde im Rahmen dieser Arbeiten nicht untersucht. Problematisch bei der Beurteilung der gefundenen Unterschiede war die Tatsache, dass die verwendeten MEFs aus zwei verschiedenen Tieren mit unterschiedlichen Geschlechtern isoliert worden waren. Zusammen mit potentiellen genetischen Varianzen, unabhängig von der Miz1/POZ-Domäne, könnte dieser Umstand möglicherweise zu den beobachteten Unterschieden in Bezug auf den autophagischen Prozess beigetragen haben, ohne dabei durch Miz1 selbst induziert worden zu sein. Darüber hinaus wäre denkbar, dass die beiden Zelllinien durch häufiges Passagieren unterschiedliche Mutationen erlangt haben (Berliner, 2011), die eventuell eine Anpassung der Zellen an das fehlende Miz1 durch Regulierung kompensatorischer Mechanismen ermöglichten. Um eine mögliche Fehlinterpretation der Rolle von Miz1 für die Autophagie durch diese potentiellen Einflussfaktoren auszuschließen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst versucht, in einer immortalisierten Zelllinie (HC11) einen transienten Knockdown des *Miz1*-Gens mit Hilfe von spezifischer siRNA zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Da sich weder durch diese Methode noch durch shRNA vermittelte RNA-Interferenz eine ausreichende Repression von Miz1 erzielen ließ, wurde ein Zellmodell (Δ POZ/Cre-ER-MEFs) entwickelt, in dem ein POZ-Domäne-Knockout des Miz1-Gens mit Hilfe des Östrogen-Rezeptor-Modulators Tamoxifen induziert werden kann (siehe Abschnitt 3.2.1). Mittels spezifischer Primer konnte zunächst in einer konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese die erwartete rekombinante Bande (das DNA-Stück, in dem die Sequenz für POZ-Domäne durch die Behandlung mit Tamoxifen ausgeschnitten wurde) nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.1). In qRT-PCR Experimenten konnte eine starke Herunterregulierung der Miz1-Expression, von ca. 85% bestätigt werden. In den Δ POZ/Cre-ER-MEFs ließ sich also zumindest auf

mRNA-Ebene ein deutlich stärkerer Knockdown des Transkriptionsfaktors erreichen als in den HC11-Zellen mittels siRNA- oder shRNA-Interferenz (siehe Abschnitt 3.2.3.1). Zur Validierung dieses Modells wäre weiterhin eine Darstellung des Knockdowns auf Proteinebene von Bedeutung gewesen. Da sich aus diesen Zellen aber nur sehr geringe Proteinmengen isolieren ließen, konnten die entsprechenden Experimente leider nicht durchgeführt werden. Eine Ursache für die geringe Proteinausbeute war, dass sich die Δ POZ/Cre-ER-MEFs relativ schwer kultivieren ließen und bereits nach wenigen Passagen seneszent wurden. Im Unterschied zu Ergebnissen aus früheren Arbeiten und den oben bereits diskutierten Experimenten in HC11-Zellen, ließ sich in den Δ POZ/Cre-ER-MEFs ohne Tamoxifenbehandlung die Expression von Miz1 durch die Zugabe von EBSS nach sechs Stunden nur in einem von drei unabhängigen Experimenten auf das in etwa Doppelte induzieren. Somit war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Miz1-Expression nach Stimulierung der Autophagie zu beobachten.

In der morphologischen Analyse der Δ POZ/Cre-ER-MEFs ließ sich im Einklang mit Beobachtungen aus früheren Arbeiten feststellen, dass MEFs mit trunkiertem Miz1 empfindlicher auf eine 6-stündige Behandlung mit EBSS reagieren, als Zellen mit vollständigem Miz1. In Bezug auf die Arbeit von Sarah Oppenheimer wurde die Expression einiger der Gene, die sich in ihrer Arbeit als Miz1-abhängig gezeigt hatten (*Atg5*, *Atg7* und *Atg4c*), in diesem Zellmodell überprüft. Alle drei untersuchten Gene ließen sich zwar durch Aminosäure-Entzug induzieren, wurden aber nach Tamoxifen-Behandlung gleichstark exprimiert wie in den unbehandelten Zellen. Für diese von den älteren Resultaten abweichenden Ergebnisse kommen verschiedene Gründe in Frage. Wie oben bereits erwähnt, wäre zum Beispiel denkbar, dass sich die verschiedenen MEF-Zelllinien, die in den früheren Arbeiten verwendet wurden, neben der deletierten POZ-Domäne auch noch durch zusätzliche, nachträglich erworbene Mutationen unterschieden. Möglicherweise stellten bestimmte Mutationen einen Selektionsvorteil für die Miz1-defizienten Zellen dar und erleichterten eine anderweitige Kompensation des fehlenden Transkriptionsfaktors. Es könnte sein, dass eine solche Mutation den autophagischen Prozess direkt beeinflusst und dadurch zu unterschiedlichen Genexpressionsmustern im Vergleich zur Kontrollzelllinie geführt hat. Weiterhin wäre denkbar, dass bereits vorhandene Atg-Protein Reserven in den Δ POZ/Cre-ER-MEFs den Aminosäureentzug in den ersten Stunden abfangen und somit die Genexpression zum gemessenen Zeitpunkt noch gar nicht im vollen Umfang induziert war. Folglich konnten auch keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit und ohne Tamoxifen gesehen werden. Falls Miz1 in diesen Zellen den autophagischen Prozess direkt reguliert, wäre außerdem vorstellbar, dass die geringe Miz1-Restexpression von circa 15% nach der Tamoxifen-Behandlung immer noch ausreicht, um den Prozess in vollem Umfang zu ermöglichen. Außerdem sind

die Eigenschaften des trunkierten Miz1, das durch die Tamoxifenbehandlung entsteht, nicht bekannt. Das Fehlen der POZ-Domäne führt zwar zu einer eingeschränkten Homooligomerisierung, eine Bindung an DNA über seine Zinkfinger wäre aber dennoch denkbar. Möglicherweise erlaubt das trunkierte, in seinen Funktionen vielleicht nur teilweise eingeschränkte Protein eine normale Regulation der Genexpression von *Atg 5*, *Atg 7* und *Atg 4c* in den Δ POZ/Cre-ER-MEFs. In der Arbeit von Wolf und Kollegen im Kleinhirngewebe von POZ-Domäne-Knockout Mäusen wurde ebenfalls keines der hier untersuchten Atg-Gene als Zielgen von Miz1 identifiziert (Wolf et al., 2013). Allerdings wurden hier aus einer Vielzahl von Genen, die an der Autophagie und deren Regulierung beteiligt sind, nur drei Gene analysiert. Durch eine Analyse weiterer relevanter Gene, könnte eventuell ein Zielgen von Miz1 identifiziert werden, womit sich der gesehene Phänotyp erklären ließe.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Autophagie beschreibt einen katabolischen Prozess, bei dem für den Abbau bestimmtes Zellmaterial in Autophagosomen eingeschlossen und durch deren Verschmelzung mit Lysosomen zersetzt wird. Durch diesen Selbstreinigungs-Vorgang trägt sie zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei und hilft durch Bereitstellung von Energielieferanten bei der Anpassung an nährstoffarme Bedingungen. Neben diesen Hauptaufgaben erfüllt die Autophagie außerdem wichtige Funktionen im Rahmen der Zellreifung, Differenzierung und bei der Immunabwehr. Ein gestörter Ablauf des autophagischen Prozesses hingegen ist mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert.

Für eine fehlerfrei ablaufende Autophagie ist das Zusammenspiel zahlreicherer Autophagie-assoziiierter Proteine notwendig, die durch verschiedene übergeordnete Systeme reguliert werden. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 in die Regulation der Autophagie involviert ist. Sowohl auf morphologischer als auch auf Genexpressionsebene wurden Unterschiede zwischen Zellen mit funktionierendem Miz1 und solchen mit trunkiertem Miz1 beobachtet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die gefundenen Unterschiede in einem verbesserten Zellmodell reproduziert und außerdem der Einfluss der Interaktion zwischen Miz1 und Myc auf den autophagischen Prozess untersucht werden. Hierfür wurde zunächst die murine Brustdrüsenzelllinie HC11 verwendet. Nach Induktion von Autophagie durch Inkubation der Zellen mit nährstoffarmem Medium wurde zuerst der zeitliche Verlauf der Expression von *Miz1* und verschiedener anderer Gene mittels quantitativer Real Time PCR untersucht. Dabei wurde nach einer anfänglichen Hochregulierung der Expression von *CDKN1a* eine zeitlich versetzte Induktion von *Miz1* und *Myc*, zusammen mit einer Herunterregulierung von *CDKN1a* beobachtet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden HC11 Zellen mit verschiedenen Konstrukten infiziert, um eine Überexpression von Miz1, Myc bzw. der Myc-Mutante V394D zu erreichen. In dieser Mutante ist eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren nicht möglich. Diese infizierten Zellen wurden dann für 6 Stunden mit EBSS behandelt und anschließend immunozytochemisch analysiert. Zur Beurteilung der autophagischen Aktivität wurden LC3-Färbungen quantifiziert. In Zellen, die Miz1 überexprimierten, konnte in diesem Experiment eine leicht erhöhte autophagische Aktivität im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle beobachtet werden. Während die Myc-überexprimierenden Zellen durch einen verstärkten Ablauf des autophagischen Prozesses auffielen, unterschieden sich Zellen die das mutierte Myc-Gen trugen kaum von den entsprechenden Kontrollzellen. Diese zuletzt genannten

Ergebnisse konnten mittels Elektronenmikroskopie reproduziert werden und sprechen dafür, dass die Interaktion zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren für die Regulierung der Autophagie eine Rolle spielt. Auch auf Genexpressionsebene konnten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien nach Induktion der Autophagie gezeigt werden. Zellen, die MycV394D überexprimierten, zeichneten sich im Vergleich zu Zellen, die mit dem regulären, nicht mutiertem Myc-Vektor infiziert waren, durch eine signifikant erhöhte Expression von *Atg5*, *Atg12* und *Spast* aus. Auch einige andere Gene zeigten unterschiedliche Expressionstendenzen nach Stimulierung der Autophagie in Abhängigkeit von den beiden Konstrukten. Der Versuch einer Herunterregulierung von Miz1 mittels sh-RNA Interferenz war leider nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Zellmodell etabliert, in dem ein POZ-Domäne-Knockout des Miz1-Gens mit Hilfe des Östrogen-Rezeptor-Modulators Tamoxifen induziert werden kann. In diesen modifizierten embryonalen Mausfibroblasten wurde im Einklang mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten beobachtet, dass ein Fehlen von Miz1 die Anpassung an nährstoffarme Bedingungen erschwert. Im Unterschied zu den früheren Experimenten, wurden in diesen Zellen jedoch keine Genexpressionsunterschiede für *Atg4c*, *Atg5* und *Atg7* in Abhängigkeit von Miz1 gemessen. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Zelllinie entwickelt, die GFP-markiertes LC3 bzw. einen entsprechenden Kontrollvektor überexprimieren und zukünftig zum Beispiel für Echtzeituntersuchungen der Autophagie in Abhängigkeit von Miz1 verwendet werden können. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nicht nur der Einfluss von Miz1 auf die Autophagie bestätigt werden, sondern zusätzlich die Relevanz einer funktionierenden Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren Miz1 und Myc für diesen essentiellen Prozess aufgezeigt werden.

5.2 Englische Zusammenfassung

Autophagy is a catabolic process in which cellular content determined for degradation is engulfed by autophagosomes and finally degraded by their fusion with lysosomes. With this self-cleaning mechanism it contributes to the maintenance of the cellular homeostasis and helps with the adaptation to nutrient-poor conditions by obtaining energy from intracellular resources. In addition to these main functions, autophagy fulfills important functions in the context of cell maturation, differentiation and for the immune system. Aside from that, an impaired autophagic process is associated with different disorders. The correct functioning of autophagy requires interaction of numerous autophagy-associated proteins which are tightly regulated. In previous works, it was already shown that the transcription factor Miz1 is involved in the regulation of autophagy. Both morphological and gene expression level differences were observed between cells with wildtype

Miz1 and cells with truncated Miz1. The aim of this thesis was to reproduce these previously found differences in an improved cell culture model and furthermore to analyze the influence of the interaction between Miz1 and Myc on the autophagic process. For that purpose, the murine mammary cell line HC11 was used. Firstly, the change of gene expression levels from *Miz1* and other genes were analyzed over time when cells were incubated with nutrient-low medium. After an initial upregulation of *CDKN1a* expression, *Miz1* and *Myc* levels increased as *CDKN1a* went down again. In the further course of this work, HC11 cells were infected with different constructs aiming to overexpress Miz1, Myc and the Myc-mutant V394D. This mutation makes Myc interaction with Miz1 not possible. These infected cells were treated with EBSS for 6 hours and subsequently immunocytochemically analyzed. Cells overexpressing Miz1 showed a slightly increased autophagic activity, as quantified by LC3 immunofluorescence, compared to the corresponding control. While cells overexpressing Myc showed a boosted autophagy, cells with the mutated Myc-sequence did not differ from control cells. The latter results could be reproduced with electron microscopy and are indicative for a role of the interaction between Miz1 and Myc in the regulation of the autophagic process. Also, differences in gene expression levels between the two cell lines could be assessed after induction of autophagy. Cells that overexpressed MycV394D were characterized by a significantly induced mRNA expression of *Atg5*, *Atg12* and *Spast* compared to cells overexpressing the non mutated Myc gene. Some additional genes showed different expression tendencies between the two constructs. A knockdown of Miz1 via interference shRNA was unfortunately not successful. For that reason, another cell model was established in which the exons that code for the POZ-domain of Miz1 are excised by the Cre-ER recombinase after tamoxifen induction. In accordance with previous results, deletion of Miz1 led to a decreased adaptation ability to a nutrient-low environment in these modified mouse embryonic fibroblasts. In contrast to previous experiments, no Miz1-dependent expression differences in *Atg4c*, *Atg5* and *Atg7* were observed. Furthermore, other cell lines overexpressing GFP-labeled LC3 and a corresponding control vector, were developed. These can be used for real time investigation of the autophagic process. Summarizing, this work not only confirmed previous results on the influence of Miz1 on autophagy but additionally demonstrated the relevance of the interaction between Miz1 and Myc in this essential process.

6 Literaturverzeichnis

Abada, A., and Elazar, Z. (2014). Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep.* *15*, 839–852.

Adhikary, S., Peukert, K., Karsunky, H., Beuger, V., Lutz, W., Elsässer, H.-P., Möröy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7648–7657.

Altiok, S., and Groner, B. (1998). Regulation of gene expression in mammary epithelial cells by cellular confluence and sequence-specific DNA binding factors. *Biochem. Soc. Symp.* *63*, 115–131.

Amati, B., Littlewood, T.D., Evan, G.I., and Land, H. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J.* *12*, 5083–5087.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Ørntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* *64*, 5245–5250.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.

Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., and Groner, B. (1988a). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J.* *7*, 2089–2095.

Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., and Groner, B. (1988b). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J.* *7*, 2089.

Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5747–5763.

Berliner, S. (2011). Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf die Regulation des Autophagieprozesses in Fibroblasten.

Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 2496–2500.

Bodemann, B.O., Orvedahl, A., Cheng, T., Ram, R.R., Ou, Y.-H., Formstecher, E., Maiti, M., Hazelett, C.C., Wauson, E.M., Balakireva, M., et al. (2011). RalB and the Exocyst Mediate the Cellular Starvation Response by Direct Activation of Autophagosome Assembly. *Cell* *144*, 253–267.

Boya, P. (2012). Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease. *Antioxidants Redox Signal.* *17*, 766–774.

- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* *15*, 713–720.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., et al. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J.* *24*, 336–346.
- Cha, H.-H., Hwang, J.R., Kim, H.-Y., Choi, S.-J., Oh, S., and Roh, C.-R. (2013). Autophagy Induced by Tumor Necrosis Factor α Mediates Intrinsic Apoptosis in Trophoblastic Cells. *Reprod. Sci.* 1933719113508816.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 98–106.
- Cherra, S.J., 3rd, Kulich, S.M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B.W., and Chu, C.T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J. Cell Biol.* *190*, 533–539.
- Cho, Y.-Y., Kim, D.J., Lee, H.S., Jeong, C.-H., Cho, E.-J., Kim, M.-O., Byun, S., Lee, K.-Y., Yao, K., Carper, A., et al. (2013). Autophagy and Cellular Senescence Mediated by Sox2 Suppress Malignancy of Cancer Cells. *Plos One* *8*, e57172.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156–159.
- Christen, P., and Jaussi, R. (2004). *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten* (Springer DE).
- Christie, G.R., Hajduch, E., Hundal, H.S., Proud, C.G., and Taylor, P.M. (2002). Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *277*, 9952–9957.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* *263*, 55–72.
- Dai, M.-S., and Lu, H. (2008). Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J. Cell. Biochem.* *105*, 670–677.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., and Ciccarone, V.C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods San Diego Calif* *33*, 95–103.
- Dean, M., Levine, R.A., Ran, W., Kindy, M.S., Sonenshein, G.E., and Campisi, J. (1986). Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.* *261*, 9161–9166.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* *10*, 51–64.
- DE DUVE, C. (1963). The lysosome. *Sci. Am.* *208*, 64–72.
- Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev.* *22*, 2755–2766.

- Eisler, H., Fröhlich, K.-U., and Heidenreich, E. (2004). Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp. Cell Res.* *300*, 345–353.
- Eskelinen, E.-L., and Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 664–673.
- Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J. Biol. Chem.* *281*, 36303–36316.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014). Metabolic Control of Autophagy. *Cell* *159*, 1263–1276.
- Ge, L., and Schekman, R. (2014). The ER-Golgi intermediate compartment feeds the phagophore membrane. *Autophagy* *10*, 170–172.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsässer, H.-P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J. Cell Biol.* *172*, 139–149.
- Gebhardt, A., Kosan, C., Herkert, B., Möröy, T., Lutz, W., Eilers, M., and Elsässer, H.-P. (2007). Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. *J. Cell Sci.* *120*, 2586–2593.
- Geng, J., and Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Rep.* *9*, 859–864.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* *221*, 3–12.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290–294.
- Graumann, W., and Sasse, D. (2004). *CompactLehrbuch Anatomie: in 4 Bänden* (Schattauer Verlag).
- Grimmel, M., Backhaus, C., and Proikas-Cezanne, T. (2015). WIPI-Mediated Autophagy and Longevity. *Cells* *4*, 202–217.
- Grolli, S., Accornero, P., Ramoni, R., Donofrio, G., and Whitelaw, C.B. (1997). Expression of c-myc is down-regulated as mouse mammary epithelial cells become confluent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *239*, 566–569.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* *141*, 656–667.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* *495*, 389–393.

- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 251–262.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805–816.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1433–1437.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 67–93.
- Hemelaar, J., Lelyveld, V.S., Kessler, B.M., and Ploegh, H.L. (2003). A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J. Biol. Chem.* *278*, 51841–51850.
- Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev.* *22*, 711–721.
- Herkert, B., and Eilers, M. (2010). Transcriptional repression: the dark side of myc. *Genes Cancer* *1*, 580–586.
- Herkert, B., Dwertmann, A., Herold, S., Abed, M., Naud, J.-F., Finkernagel, F., Harms, G.S., Orian, A., Wanzel, M., and Eilers, M. (2010). The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *J. Cell Biol.* *188*, 905–918.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H.-P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol. Cell* *10*, 509–521.
- Holzapfel, B., and Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit* *37*, 120–126.
- Hönnemann, J., Sanz-Moreno, A., Wolf, E., Eilers, M., and Elsässer, H.-P. (2012). Miz1 is a critical repressor of cdkn1a during skin tumorigenesis. *Plos One* *7*, e34885.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1981–1991.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Ishida, Y., Nayak, S., Mindell, J.A., and Grabe, M. (2013). A model of lysosomal pH regulation. *J. Gen. Physiol.* *141*, 705–720.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* *6*, 764–776.

- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* 19, 5360–5372.
- Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). Insulin-like growth factor-1 and TNF- α regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol. Cell Biol.* 84, 448–454.
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25, 1327–1337.
- Jin, J., and Harper, J.W. (2003). A license to kill: Transcriptional activation and enhanced turnover of Myc by the SCFSkp2 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 3, 517–518.
- Juenemann, K., and Reits, E.A. (2012). Alternative Macroautophagic Pathways. *Int. J. Cell Biol.* 2012.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J.* 19, 5720–5728.
- Kaushik, S., Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kiffin, R., Martinez-Vicente, M., Kon, M., Orenstein, S.J., Wong, E., and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 495–499.
- Kelly, K.F., and Daniel, J.M. (2006). POZ for effect—POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol.* 16, 578–587.
- Kerosuo, L., Piltti, K., Fox, H., Angers-Loustau, A., Häyry, V., Eilers, M., Sariola, H., and Wartiovaara, K. (2008). Myc increases self-renewal in neural progenitor cells through Miz-1. *J. Cell Sci.* 121, 3941–3950.
- Kim, J., and Guan, K.-L. (2011). Amino acid signaling in TOR activation. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1001–1032.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 33, 109–122.
- Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151–175.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425–434.
- Kosan, C., Saba, I., Godmann, M., Herold, S., Herkert, B., Eilers, M., and Möröy, T. (2010). Transcription factor miz-1 is required to regulate interleukin-7 receptor signaling at early commitment stages of B cell differentiation. *Immunity* 33, 917–928.

- Kraft, C., and Martens, S. (2012). Mechanisms and regulation of autophagosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 496–501.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 1004–1010.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* *432*, 1032–1036.
- Kuma, A., Matsui, M., and Mizushima, N. (2007). LC3, an Autophagosome Marker, Can be Incorporated into Protein Aggregates Independent of Autophagy: Caution in the Interpretation of LC3 Localization. *Autophagy* *3*, 323–328.
- Kurland, J.F., and Tansey, W.P. (2008). Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer Res.* *68*, 3624–3629.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lai, J.-Y., and Pittelkow, M.R. (2004). Culture confluence regulates gene expression of normal human keratinocytes. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* *12*, 613–617.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Lee, I.H., Kawai, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Bishop, A.J.R., Motoyama, N., Cao, L., and Finkel, T. (2012). Atg7 Modulates p53 Activity to Regulate Cell Cycle and Survival During Metabolic Stress. *Science* *336*, 225–228.
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.-B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. Cb* *17*, 1561–1567.
- Li, M., Hou, Y., Wang, J., Chen, X., Shao, Z.-M., and Yin, X.-M. (2011). Kinetics Comparisons of Mammalian Atg4 Homologues Indicate Selective Preferences toward Diverse Atg8 Substrates. *J. Biol. Chem.* *286*, 7327–7338.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* *69*, 1125–1136.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* *10*, 776–787.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672–676.
- Lin, N.-Y., Beyer, C., Gießl, A., Kireva, T., Scholtysek, C., Uderhardt, S., Munoz, L.E., Dees, C., Distler, A., Wirtz, S., et al. (2013). Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 761–768.

- Liu, J., Zhao, Y., Eilers, M., and Lin, A. (2009). Miz1 is a signal- and pathway-specific modulator or regulator (SMOR) that suppresses TNF-alpha-induced JNK1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18279–18284.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001a). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001b). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 741–752.
- Martin, T.D., Chen, X.-W., Kaplan, R.E.W., Saltiel, A.R., Walker, C.L., Reiner, D.J., and Der, C.J. Ral and Rheb GTPase Activating Proteins Integrate mTOR and GTPase Signaling in Aging, Autophagy, and Tumor Cell Invasion. *Mol. Cell.*
- Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell* *137*, 1062–1075.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* *11*, 385–396.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* *190*, 511–521.
- Meijer, A.J., and Codogno, P. (2009). Autophagy: regulation and role in disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *46*, 210–240.
- Menzies, F.M., Fleming, A., and Rubinsztein, D.C. (2015). Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 345–357.
- Mitchener, J.S., Shelburne, J.D., Bradford, W.D., and Hawkins, H.K. (1976). Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am. J. Pathol.* *83*, 485–492.
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 132–139.
- Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* *12*, 823–830.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998). A New Protein Conjugation System in Human THE COUNTERPART OF THE YEAST Apg12p CONJUGATION SYSTEM ESSENTIAL FOR AUTOPHAGY. *J. Biol. Chem.* *273*, 33889–33892.

- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* *116*, 1679–1688.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010a). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* *140*, 313–326.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010b). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* *140*, 313–326.
- Möröy, T., Saba, I., and Kosan, C. (2011). The role of the transcription factor Miz-1 in lymphocyte development and lymphomagenesis—Binding Myc makes the difference. *Semin. Immunol.* *23*, 379–387.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *51 Pt 1*, 263–273.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* *306*, 1037–1040.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* *13*, 619–624.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* *461*, 654–658.
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., et al. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14238–14243.
- Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* *273*, 3963–3966.
- Ohashi, Y., and Munro, S. (2010). Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3998–4008.
- Oppenheimer, S. (2009). Betrachtung der Autophagie und der Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene in Miz1-POZ-Domäne knockout MEFs.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1860–1873.
- Patel, J.H., and McMahon, S.B. (2007). BCL2 is a downstream effector of MIZ-1 essential for blocking c-MYC-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *282*, 5–13.

- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J.* *16*, 5672–5686.
- Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1054–1060.
- Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Res.* *1695*, 55–72.
- Poumay, Y., and Pittelkow, M.R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.* *104*, 271–276.
- Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C.O., Menzies, F.M., Narayanan, U., Renna, M., et al. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 1707–1711.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010a). Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* *90*, 1383–1435.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010b). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* *12*, 747–757.
- Rebecca, V.W., and Amaravadi, R.K. (2015). Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene*.
- Riggelen, J. van, Müller, J., Otto, T., Beuger, V., Yetil, A., Choi, P.S., Kosan, C., Möröy, T., Felsher, D.W., and Eilers, M. (2010). The interaction between Myc and Miz1 is required to antagonize TGFbeta-dependent autocrine signaling during lymphoma formation and maintenance. *Genes Dev.* *24*, 1281–1294.
- Van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 301–309.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* *15*, 741–750.
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M.W., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.-P., Brech, A., Bilder, D., et al. (2007). ESCRTs and Fab1 Regulate Distinct Steps of Autophagy. *Curr. Biol.* *17*, 1817–1825.
- Saba, I., Kosan, C., Vassen, L., and Möröy, T. (2011). IL-7R-dependent survival and differentiation of early T-lineage progenitors is regulated by the BTB/POZ domain transcription factor Miz-1. *Blood* *117*, 3370–3381.

- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–1501.
- Sanz-Moreno, A., Fuhrmann, D., Wolf, E., von Eyss, B., Eilers, M., and Elsässer, H.-P. (2014). Miz1 deficiency in the mammary gland causes a lactation defect by attenuated stat5 expression and phosphorylation. *Plos One* *9*, e89187.
- Sanz-Moreno, A., Fuhrmann, D., Zankel, A., Reingruber, H., Kern, L., Meijer, D., Niemann, A., and Elsässer, H.-P. (2015). Late onset neuropathy with spontaneous clinical remission in mice lacking the POZ domain of the transcription factor Myc-interacting zinc finger protein 1 (Miz1) in Schwann cells. *J. Biol. Chem.* *290*, 727–743.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 596–603.
- Sarkar, S., Perlstein, E.O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R.L., Webster, J.A., Lewis, T.A., O’Kane, C.J., Schreiber, S.L., et al. (2007). Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington’s disease models. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 331–338.
- Schamberger, C.J., Gerner, C., and Cerni, C. (2005). Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* *302*, 115–128.
- Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr. Biol.* *9*, 1255–1258.
- Seoane, J., Le, H.-V., and Massagué, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* *419*, 729–734.
- Shimobayashi, M., and Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 155–162.
- Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* *306*, 990–995.
- Shui, W., Sheu, L., Liu, J., Smart, B., Petzold, C.J., Hsieh, T., Pitcher, A., Keasling, J.D., and Bertozzi, C.R. (2008). Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16952–16957.
- Singh, R., and Cuervo, A.M. (2011). Autophagy in the Cellular Energetic Balance. *Cell Metab.* *13*, 495–504.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76–85.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massagué, J., Hänel, F., et al. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat. Cell Biol.* *3*, 392–399.

- Stanley, R.E., Ragusa, M.J., and Hurley, J.H. (2014). The beginning of the end: How scaffolds nucleate autophagosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* *24*.
- Stead, M.A., Trinh, C.H., Garnett, J.A., Carr, S.B., Baron, A.J., Edwards, T.A., and Wright, S.C. (2007). A beta-sheet interaction interface directs the tetramerisation of the Miz-1 POZ domain. *J. Mol. Biol.* *373*, 820–826.
- Stogios, P.J., Cuesta-Seijo, J.A., Chen, L., Pomroy, N.C., and Privé, G.G. (2010). Insights into strand exchange in BTB domain dimers from the crystal structures of FAZF and Miz1. *J. Mol. Biol.* *400*, 983–997.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2503–2518.
- Tanida, I., Yamaji, T., Ueno, T., Ishiura, S., Kominami, E., and Hanada, K. (2008). Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. *Autophagy* *4*, 131–134.
- Toh, P.P.C., Luo, S., Menzies, F.M., Raskó, T., Wanker, E.E., and Rubinsztein, D.C. (2013). Myc inhibition impairs autophagosome formation. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 5237–5248.
- Tooze, S.A., and Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* *12*, 831–835.
- Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., and Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* *321*, 117–120.
- Tukaj, C. (2013). The significance of macroautophagy in health and disease. *Folia Morphol.* *72*, 87–93.
- Vance, J.E., and Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Biol. Lipids* *1831*, 543–554.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* *3*, RESEARCH0034.
- Velikkakath, A.K.G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2012). Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* *23*, 896–909.
- Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K.E., von Eyss, B., Herold, S., Rycak, L., Dumay-Odelot, H., Karim, S., Bartkuhn, M., et al. (2014). Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature* *511*, 483–487.
- Wang, R.C., and Levine, B. (2010). Autophagy in cellular growth control. *Febs Lett.* *584*, 1417–1426.
- Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.-G., and Eilers, M. (2008). A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat. Cell Biol.*

- Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *Embo J.* *29*, 27–40.
- Weber, A., Marquardt, J., Elzi, D., Forster, N., Starke, S., Glaum, A., Yamada, D., Defossez, P.-A., Delrow, J., Eisenman, R.N., et al. (2008). Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *Embo J.* *27*, 1563–1574.
- Webert, C. (2011). Autophagischer Abbau induzierter Proteinkristalle in AR4-2J-Zellen.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Embo J.* *29*, 1792–1802.
- Wek, S.A., Zhu, S., and Wek, R.C. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4497–4506.
- Wieland, T. (1987). [50 years of phalloidine: its discovery, characterization and current and future applications in cell research]. *Naturwissenschaften* *74*, 367–373.
- Wiese, K.E., Walz, S., von Eyss, B., Wolf, E., Athineos, D., Sansom, O., and Eilers, M. (2013). The Role of MIZ-1 in MYC-Dependent Tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*.
- Wolf, E., Gebhardt, A., Kawauchi, D., Walz, S., von Eyss, B., Wagner, N., Renninger, C., Krohne, G., Asan, E., Roussel, M.F., et al. (2013). Miz1 is required to maintain autophagic flux. *Nat. Commun.* *4*.
- Yamaguchi, M., Noda, N.N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., Akada, R., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2012). Structural Insights into Atg10-Mediated Formation of the Autophagy-Essential Atg12-Atg5 Conjugate. *Structure* *20*, 1244–1254.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* *23*, 33–42.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* *12*, 814–822.
- Yang, J., Carra, S., Zhu, W.-G., and Kampinga, H.H. (2013). The Regulation of the Autophagic Network and Its Implications for Human Disease. *Int. J. Biol. Sci.* *9*, 1121–1133.
- Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., and Sinicrope, F.A. (2011). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 1533–1541.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* *5*, 1180–1185.
- Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Köchl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S.A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* *119*, 3888–3900.

Zavodszky, E., Vicinanza, M., and Rubinsztein, D.C. (2013). Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. *Febs Lett.* 587, 1988–1996.

Zhou, F., Yang, Y., and Xing, D. (2011). Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Febs J.* 278, 403–413.

Ziegelbauer, J., Shan, B., Yager, D., Larabell, C., Hoffmann, B., and Tjian, R. (2001). Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association. *Mol. Cell* 8, 339–349.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ΔPOZ/Cre-ER-MEFs	embryonale Mausfibroblasten, in denen mit Hilfe des Östrogenrezeptor-Modulators Tamoxifen ein Miz1-Knockdown induziert werden kann
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	<i>engl.: analysis of variance; dt.: Varianzanalyse</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Atg	Autophagie-assoziiertes Gen
ATP	Adenosintriphosphat
AV	autophagische Vakuole
BCA	Bicinchoninicsäure
Bcl2	<i>engl.: B-cell lymphoma 2</i>
BH	<i>engl.: Bcl2-homology</i>
bidest.	bidestilliert
Bif1	<i>engl.: Bax-interacting factor</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTB/POZ-Komplex	<i>engl.: poxvirus and zinc finger/bric-à-brac, tramtrack and broad- complex</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin

ca.	circa
CDKN	<i>engl.: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>
cDNA	<i>engl.: complementary DNA; dt.: komplementäre DNS</i>
cm	Zentimeter
CMA	<i>engl.: Chaperone-mediated autophagy; dt.: Chaperon-vermittelte Autophagie</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	<i>engl.: cycle threshold</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cu	Kupfer
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.: deoxyribonucleic acid; dt.: Desoxyribonukleinsäure (DNS)</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E (1-3)	Enzym (1-3)
EBSS	<i>engl.: Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>engl.: epidermal growth factor; dt.: epidermaler Wachstumsfaktor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>Lat.: et alii; dt: und andere</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell

FBS	<i>engl.: fetal bovine serum; dt.: Fetales Kälberserum</i>
FCS	<i>engl.: fetal calf serum; dt.: Fetales Kälberserum</i>
FITC	Fluorescein
g	gram
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>engl.: green fluorescent protein; dt.: grün fluoreszierendes Protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Proton
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>engl.: Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HKG	Housekeeping-Gen = Referenzgen
HLH	<i>engl.: helix-loop-helix</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>engl.: horseradish peroxidase; dt.: Meerrettichperoxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid

I	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LC3 = MAP1LC3A	<i>engl.: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A</i>
m	milli
mm	Millimeter
M	molar (mol/L)
mA	Milliampere
MAM	Mitochondrien-assoziierte Membran
MAX	<i>engl.: myc-associated factor X</i>
MEFs	<i>engl.: Mouse Embryonic Fibroblasts; dt.: embryonale Mausfibroblasten</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Miz1	<i>engl.: Myc-interacting zinc-finger protein 1</i>
Miz1 ^{hi}	ΔPOZ/Cre-ER-MEFs, die normale Miz1-Level exprimieren
Miz1 ^{lo}	ΔPOZ/Cre-ER-MEFs, in denen die Expression von Miz1 nach einer Behandlung mit Tamoxifen herunterreguliert ist
mol	Mol
mRNA	<i>engl.: messenger RNA; dt.: Boten-RNA</i>
mTOR	<i>engl.: mechanistic (früher: mammalian) Target of Rapamycin</i>
MTORC	<i>engl.: mechanistic target of rapamycin complex</i>
MW	Molekulargewicht
MycVD = MycV394D	Myc-Mutante, in der die Bindung zwischen Miz1 und Myc nicht möglich ist
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NPM	Nucleophosmin

n.s.	nicht signifikant
N-Terminus	Amino-Terminus
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
OsO ₄	Osmium(VIII)-oxid
pB	pBABE
PBS	<i>engl.: Phosphate-buffered saline; dt.: Phosphatgepufferte Saline</i>
PBST	Phosphatgepufferte Saline mit Tween-20
PCR	<i>engl.: Polymerase Chain Reaction; dt.: Polymerase-Kettenreaktion</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR = qRT-PCR	<i>engl.: real-time quantitative PCR; dt.: quantitative Echtzeit-PCR</i>
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
rG	relative Genexpression
RNA	<i>engl.: ribonucleic acid; dt.: Ribonukleinsäure</i>
Rpm	<i>engl.: revolutions per minute; dt.: Umdrehungen pro Minute</i>
RT	Raumtemperatur
s = sek	Sekunde
s.o.	siehe oben
SD	<i>engl.: standard deviation; dt.: Standardabweichung</i>
SDS	<i>engl.: Sodium Dodecyl Sulfate; dt.: Natriumlaurylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>engl.: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shRNA	<i>engl.: short hairpin RNA</i>
shMiz1	durch shRNA vermittelter Knockdown von Miz1

shScr	Kontrollvektor für shRNA-Expressionsvektoren
siRNA	<i>engl.: small interfering RNA</i>
SOCS1	<i>engl.: suppressor of cytokine signaling 1</i>
ss	<i>engl.: single strand; dt.: einzelsträngig</i>
STAT	<i>engl.: Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>engl.: Tris-buffered Saline; dt.: Tris-gepufferte Saline</i>
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween-20
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>engl.: Transforming growth factor β; dt.: transformierender Wachstumsfaktor β</i>
TGN	Transgolgi-Netzwerk
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TopBP1	<i>engl.: DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRITC	Tetramethylrhodamine
tRNA	Transfer-RNA
TSC 1/TSC 2	Hamartin-Tuberin-Komplex
TUNEL	<i>engl.: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	<i>engl.: unit; dt.: Einheit</i>
u.a.	unter anderem
ULK	<i>engl.: UNK-51-like kinase</i>
UV	ultraviolett
UVRAG	<i>engl.: UV radiation resistance-associated gene protein</i>
V	Volt

v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WT	Wiltotyp
YFP	<i>engl.: yellow fluorescent protein</i> , dt.: gelb fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer für die Überlassung des interessanten Themas und die beispielhafte Betreuung. Mit zahlreichen Diskussionen und theoretischen sowie praktischen Tipps hat er mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt und meine Begeisterung für die Forschung geweckt. Vielen Dank dafür, Pi!

Darüberhinaus einen herzlichen Dank an alle meine Laborkollegen, die mir stets hilfsbereit und geduldig in allen Fragen zur Seite standen. Die vielen Unterhaltungen und Diskussionen haben mir sehr dabei geholfen mich als „Medizinerin“ in der experimentellen Laborwelt einzufinden. Besonderer Dank gebührt hierbei Dr. Adrián Sanz Moreno für die gewissenhafte und umfassende Einführung in sämtliche Labormethoden, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Bei Ursula Lehr möchte ich mich für die technische Unterstützung in der Zellkultur und bei der Elektronenmikroskopie bedanken.

Die freundschaftliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe hat das Labor für mich zu einem Ort gemacht, an dem ich mich immer wohlfühlt und gern gearbeitet habe. Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich auch nochmal ganz besonders bei Dr. Adrián Sanz Moreno, Dr. Jan Hönnemann und Corina Webert bedanken, die über den Laboralltag hinaus auch mein Privatleben sehr bereichert haben.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die Ermöglichung meines Studiums bedanken. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch ganz besonders herzlich bei meinem Freund bedanken. Mit vielen motivierenden Worten hat er mich stets in meiner Arbeit bestärkt. Seine zahlreichen fachlichen Ratschläge, aber natürlich auch die ausgleichenden Freizeitaktivitäten haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Lym!

Liste akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität in Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Basler, Baum, Becker, Czubayko, Daut, Eilers, Elsässer, Feuser, Graz, Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschnik, Hassan, Hertel, Hilt, Hoyer, Kann, Kircher, Klose, Koolman, Lill, Lohoff, Luers, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Opitz, Plant, Post, Renz, Richter, Riße, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schrader, Sekundo, Tackenberg, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf