

Zelluläre Homöostase

WIPI-Proteine in der Autophagie humaner Zellen

TASSULA PROIKAS-CEZANNE
INTERFAKULTÄRES INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGIE, UNIVERSITÄT TÜBINGEN

Autophagie hält unsere Zellen jung. Funktionelle Dysregulationen der Autophagie korrelieren mit der Entwicklung von altersbedingten Erkrankungen des Menschen. WIPI-Proteine sind entscheidende Faktoren im Prozess der Autophagie und könnten sich als therapeutische Zielstrukturen eignen.

Autophagy secures cellular youth. Functional dysregulation of autophagy correlates with age-related human diseases. WIPI proteins are crucial factors in the process of autophagy and provide a putative target for therapeutic modulation of autophagy.

Autophagie

■ Autophagie ist ein essenzieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, der frühzeitig in der Evolution entstanden ist [1]. Die Aufgabe der Autophagie ist es, zytoplasmatische Bestandteile, darunter langlebige Proteine und Zellorganellen, abzubauen und dem zellulären Recyclingprozess wieder zuzuführen. Die Autophagie ist auf einem basalen Niveau kontinuierlich aktiv, wird aber gezielt in Stresssituationen aktiviert. Liegen Nährstoffe in unzureichender Menge vor, leiten betroffene Zellen gezielt autophagosomale Prozesse zur Kompensation ein und beginnen, zelleigene Bestandteile zu verdauen. Daher die Bezeichnung Autophagie, wörtlich Selbstfressen (griech. *auto*: selbst, *phagia*: fressen). In Extremsituatio-

nen, z. B. bei schwerwiegenden Zellschädigungen, kann entweder die Apoptose oder aber der sogenannte autophagosomale Zelltod – ein nicht apoptotischer, programmierter Zelltod – eingeleitet werden.

Einzigartig für den Prozess der Autophagie ist die Ausbildung des Autophagosoms, ein zelluläres Vesikel, das das abzubauen Material (Cargo) mit einer Doppelmembran umschließt und nachfolgend – zum proteolytischen Abbau – mit Lysosomen fusioniert. Das Cargo ist durch die Doppelmembran des Autophagosoms vom Zytoplasma abgeschlossen, sodass kein Entweichen erfolgen kann.

Die normal verlaufende Autophagie ist an wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt ist. Dazu gehören:

- Überdauern natürlicher zellulärer Hungerzustände,
- Eliminierung von Organellen, die entweder überzählig (Peroxisomen) oder geschädigt (Mitochondrien) sind,
- Eliminierung von intrazellulären Proteinaggregaten,
- Eliminierung von infektiösen Erregern (Bakterien, Viren).

Autophagie ist also ein Mechanismus zur Überlebenssicherung der einzelnen Zelle, zugleich aber auch ein Selbstmord-Programm

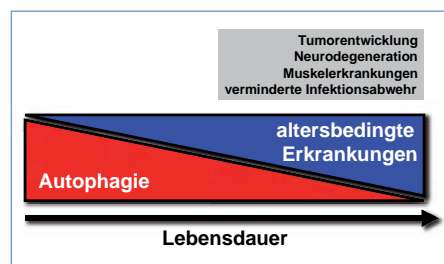
für geschädigte Zellen, um das Überleben eines multizellulären Organismus zu sichern. Es ist daher leicht zu verstehen, dass eine fehlregulierte oder verminderte autophagische Aktivität, wie wir sie vermutlich im Alter vorfinden, zwangsläufig in ein zelluläres Desaster führen muss, das sich in einer ganzen Bandbreite von Krankheiten manifestiert (**Abb. 1, [2]**):

- Entstehung von Krebs (fehlende Tumorsuppression, fehlregulierter Zelltod, fehlende Eliminierung geschädigter Organellen),
- Ansammlung neurodegenerativer Plaques bei Demenzerkrankungen (gestörter intrazellulärer Proteinabbau),
- Muskelerkrankungen (neuromuskuläre Syndrome, Myopathien),
- Infektionserkrankungen (gestörte autophagosomale Eliminierung intrazellulärer Erreger),
- funktionelle Leberinsuffizienz.

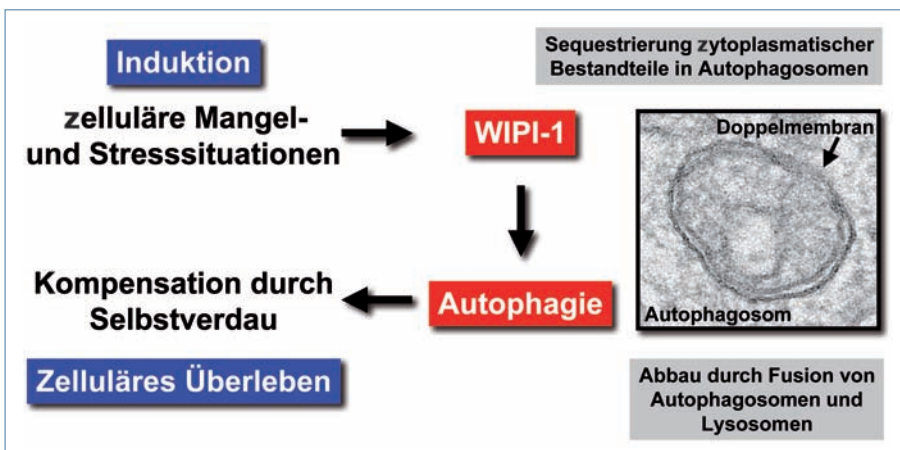
Unverstanden ist, welchen Vorteil bzw. welchen Nachteil die Autophagie der Tumorzelle in verschiedenen Stadien der Tumorphase bietet. Die Tumorzelle kann die Autophagie-Maschinerie, ebenso wie pathogene Erreger, nutzen. Eine Hochregulation der Autophagie im Frühstadium der Tumorentstehung kann der Tumorzelle so eine relative Unabhängigkeit von umgebenden Nährbedingungen verschaffen. Im Endstadium der Progression aber behindert eine funktionierende Autophagie das autonome Überleben der Tumorzelle: Die Autophagie, ebenso wie die Apoptose, wird herunterreguliert, um dem Tod zu entkommen. Dieses Zusammenspiel – bislang hypothetisch – möchten wir verstehen lernen.

WIPI

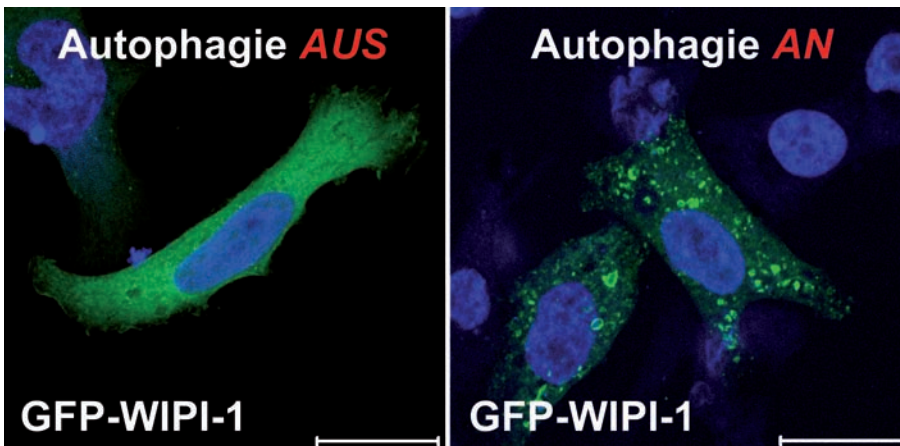
Mithilfe des entwickelten *no-hybrid*-Verfahrens [3] haben wir eine neuartige, humane WD40-Proteinfamilie identifiziert, die WIPI-Familie (WIPI: *WD40-repeat protein interacting with phosphoinositides*). Humane WIPI-Gene sind evolutionär hochkonserviert und



▲ **Abb. 1:** Modell zur verminderten Aktivität der Autophagie und der Entwicklung altersbedingter Erkrankungen des Menschen.



▲ **Abb. 2:** Modell zum Prozess der Autophagie. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Autophagosoms in humanen U2OS-Zellen nach Induktion der Autophagie durch Aminosäuremangel. Weitere Erklärungen im Text (Kooperation der Teilprojekte A3/Proikas-Cezanne und Z2/Schaller im SFB 773 der DFG).



▲ **Abb. 3:** WIPI-1 Puncta-Formation Assay (Deutsche Patentanmeldung P 44 586 DE). Intrazelluläre Lokalisation von grün fluoreszierendem WIPI-1-Protein zur Messung der Autophagie in humanen Zellen. Transiente Transfektion von GFP-WIPI-1 und Anfärbung der Zellkerne mit TOPRO3 (blau). Maßstab: 20 µm.

Homologe existieren auch in Hefen und Pflanzen [4]. Wir erkannten eine interessante Korrelation zwischen fehlregulierter WIPI-Genexpression und Tumorprogression; unsere Experimente deuten auf eine aberrante Genexpression aller WIPI-Gene (*WIPI-1*, -2, -3 und -4) in verschiedenen Tumoren menschlicher Patienten hin. So ist z. B. die Expression von *WIPI-1* in Tumoren der Haut und in verschiedenen malignen Melanom-Zelllinien stark erhöht. Eine erhöhte Expression von *WIPI-1* und *WIPI-3* haben wir respektive im Cervixkarzinom und in Tumoren des Uterus gefunden. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *WIPI-2* und *WIPI-4* im Nierenkarzinom und in Tumoren des Pankreas nahezu ausgeschaltet [4]. Wir möchten dringend die Frage beantworten, ob die WIPI-Gene als Tumorsuppressorgene wirken können und somit

direkten Einfluss auf die Tumorentstehung nehmen.

WIPI-1 und Autophagie

Ein intrazelluläres Signalnetzwerk reguliert die Autophagie. Dieses Signalnetzwerk ist weitgehend unbekannt. Man kennt bislang zwei prinzipielle Arten der Signalgebung zur Regulation der Autophagie in allen Organismen: Hemmung der Autophagie durch die mTOR-Proteinkinase und Aktivierung der Autophagie durch die PI3-Lipidkinase Klasse III. Die aktivierte PI3-Lipidkinase Klasse III generiert das Phospholipid PI(3)P, ein essenzieller Bestandteil der Membranen von Autophagosomen.

Wir haben gefunden, dass WIPI-1 eine wesentliche Komponente der Autophagie in menschlichen Zellen ist [4, 5]. Interessanter-

weise ist das Produkt der PI3-Lipidkinase III, das Phospholipid PI(3)P, Bindungspartner von WIPI-1. Wir postulieren, dass WIPI-1 der Effektor der PI3-Lipidkinase III ist und dadurch die Einleitung der Autophagie reguliert. Unsere elektronenmikroskopischen Daten zeigen eindeutig die Lokalisation von WIPI-1 an autophagosomalen Strukturen [5]. Unsere unveröffentlichten Resultate weisen darüber hinaus auf den bislang unbekanntem Ursprung autophagosomaler Membranen hin. Ebenso haben wir nunmehr Kenntnis davon, mit welchen Autophagie-Proteinen WIPI-1 in humanen Zellen funktionell interagieren kann, und konnten zeigen, dass diese Interaktion abhängig von dynamischen Mikrotubuli ist [6]. Wir postulieren, dass WIPI-1 aufgrund seiner PI(3)P-Bindung den Ort der Erzeugung der autophagosomalen Membran definiert (**Abb. 2**).

WIPI Puncta-Formation Assay

Wir können WIPI-1 bereits als neuartigen Marker der Autophagie in menschlichen Zellen einsetzen [5, 7, 8]. In dem von uns entwickelten WIPI-1 Puncta-Formation Assay visualisieren wir WIPI-1 durch Fluoreszenzmikroskopie (**Abb. 3**). Die autophagosomale Aktivität hat unmittelbare Auswirkungen auf das Verteilungsmuster von WIPI-1 in der Zelle: Inaktive Autophagie wird durch eine gleichförmige zytoplasmatische Verteilung von WIPI-1 angezeigt, während aktive Autophagie mit einer kontrastreichen Akkumulation von WIPI-1 (WIPI-1 Puncta) an großen schlauch- und vesikelförmigen autophagosomalen Membranen korreliert (**Abb. 3**). Den WIPI-1 Puncta-Formation Assay haben wir für *high-throughput*- und *high-content*-Analysen automatisiert [9].

Ausblick

Folgende Fragen stehen derzeit im Fokus der Arbeitsgruppe: Sind alle WIPI-Proteine Effektoren der Autophagie in humanen Zellen? Definieren WIPI-Proteine zelluläre Membranen für die Ausbildung von Autophagosomen? Kann eine gezielte Modulation der WIPI-Proteine das An- bzw. Ausschalten der Autophagie bewirken? Die Beantwortung dieser Fragen soll einen Beitrag zum molekularen Verständnis des Prozesses der Autophagie und seiner Regulation leisten.

Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Anja Gaugel, Katharina Hentschel, Anke

Jacob, Sandra Freiberger, Mario Mauthe und Simon Pfisterer für ihr Engagement und ihren Teamgeist bedanken. Die Arbeiten wurden unterstützt von der Thyssen-Stiftung, der Landesstiftung Baden-Wuerttemberg, dem BMBF (BioProfile) und dem SFB 773 der DFG. ■

Literatur

- [1] Ohsumi Y (1999) Molecular mechanism of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *MPhilos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354:1577–1581
- [2] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM et al. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069–1075
- [3] Waddell S, Jenkins JR, Proikas-Cezanne T (2001) A „no-hybrids“ screen for functional antagonizers of human p53 transactivator function: dominant negativity in fission yeast. *Oncogene* 20:6001–6008
- [4] Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A et al. (2004) WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* 23:9314–9325
- [5] Proikas-Cezanne T, Ruckerbauer S, Stierhof YD et al. (2007) Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett* 581:3396–3404
- [6] Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG et al. (2010) Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem*, im Druck
- [7] Proikas-Cezanne T, Pfisterer SG (2009) Assessing mammalian autophagy by WIPI-1/Atg18 puncta formation. *Methods Enzymol* 452:247–260
- [8] Vergne I, Roberts E, Elmaoued RA et al. (2009) Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jump. *EMBO J* 28:2244–2258
- [9] Grote-meier A, Alers S, Pfisterer SG et al. (2010) AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca(2+) increase. *Cell Signal* 22:914–925

Korrespondenzadresse:

Dr. Tassula Proikas-Cezanne
Abteilung Molekularbiologie
Interfakultäres Institut für Zellbiologie
Eberhard Karls Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 15
D-72076 Tübingen
Tel.: 07071-29788-95
Fax: 07071-295359
tassula.proikas-cezanne@uni-tuebingen.de

AUTOR



Tassula Proikas-Cezanne

1995 Promotion, externe Doktorarbeit der Universität Hamburg am Max-Planck-Institut/Max-Delbrück-Laboratorium in Köln. 1995–1999 Postdoc am Marie Curie Cancer Research Institute in Oxford, UK. 1999–2003 Postdoc und Scientific Consultant an der Temple University, Philadelphia, PA, USA und Onco-nova Therapeutics Inc., Princeton, NJ, USA. Seit 2004 unabhängige Arbeitsgruppenleiterin am Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen.