

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xiv
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungen	xvii
Veröffentlichungen	xix
1 Einleitung	1
1.1 Die Eukaryotische Zelle	1
1.1.1 Struktur der Organellen und Proteintransport	1
1.2 Endoplasmatisches Reticulum	3
1.2.1 Proteinimport in das ER	4
1.2.2 Das Translokon	4
1.2.3 Anterograder Transport	5
1.2.4 ARF	6
1.2.5 Retrograder Transport	7
1.2.6 <i>sec</i> -Mutanten	7
1.3 Autophagocytose	7
1.3.1 Nomenklatur	9
1.3.2 Zwei neue ubiquitinähnliche Konjugationssysteme	9
1.3.3 Regulation der Autophagocytose	11
1.3.4 Fusion und Abbau	13
1.3.5 Unterteilung der Autophagocytose	13
1.3.6 ER-Beteiligung an der Autophagocytose?	14
1.4 Peroxisomen	15
1.4.1 Untersuchung der Peroxisomenbiogenese	16
1.4.2 Import peroxisomaler Matrixproteine	16
1.4.3 Peroxisomale Membranbiogenese	20

2	Aufgabenstellung	25
2.1	Mutantenuntersuchung	25
2.2	Präperoxisomale Membranstrukturen	28
2.3	Komplexisolierung	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Materialien und Stämme	29
3.1.1	Materialien	29
3.1.2	Bakterienstämme	29
3.1.3	Hefestämme	30
3.1.4	Plasmide	32
3.1.5	In dieser Arbeit erstellte Konstrukte	32
3.1.6	Verwendete Oligonukleotide	32
3.1.7	Medien	33
3.2	Allgemeine Methoden	35
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	35
3.2.2	Ligation	35
3.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	36
3.2.4	Hefetransformation	36
3.2.5	Gesamtzellaufschluss nach Yaffe und Schatz	37
3.2.6	Wachstumstest	38
3.2.7	Präparation von genomischer DNA aus Hefen	38
3.2.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
3.2.9	Westernblot	41
3.2.10	Immunfluoreszenzmikroskopie	43
3.3	Mutantenuntersuchung	45
3.3.1	Anzucht der <i>sec</i> -Mutanten	45
3.3.2	Anzucht der nicht-temperatursensitiven Mutanten	45
3.3.3	Mikroskopie	45
3.3.4	Subzelluläre Fraktionierung	46
3.3.5	Elektronenmikroskopie	47
3.4	Dichtegradientenzentrifugation	48
3.4.1	Lösungen	48
3.4.2	Anzucht der Hefezellen	49
3.4.3	Präparation des <i>post nuclear supernatant</i>	49

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.4	Präparation des Saccharosegradienten	49
3.4.5	Probenaufarbeitung	50
3.5	Komplexisolierung	51
3.5.1	Präparation der IgG-Sepharose	51
3.5.2	Digitoninreinigung	52
3.5.3	Co-Immunpräzipitation	52
3.5.4	Blaue-Native-Gelelektrophorese	53
3.5.5	Subzelluläre Fraktionierung von Pex3p	54
3.5.6	Flotationsgradient	55
3.5.7	Vernetzung von Proteinen	55
3.6	Informationstechnische Hilfsmittel	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Mutantenuntersuchung	57
4.1.1	<i>sec</i> -Mutanten	57
4.1.2	ER-Mutanten	66
4.1.3	YidC-Homologe	71
4.1.4	Autophagocytosemutanten	73
4.1.5	Pex16p-Homologiesuche	77
4.2	Untersuchung von <i>ghosts</i>	79
4.2.1	Saccharosegradientenzentrifugation	79
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	85
4.3	Der Pex3p-Komplex	86
4.3.1	Pex3p-Protein A	88
4.3.2	Komplexisolierung	89
4.3.3	Blaue-Native Gelelektrophorese	92
4.3.4	Vernetzungsexperimente	96
4.3.5	Pex3p im Cytosol?	97
5	Diskussion	101
5.1	Peroxisomen und ER	101
5.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	101
5.1.2	Biochemische Untersuchungen	103
5.1.3	<i>ret2-1</i> und <i>sec23-1</i>	104
5.1.4	Neue Wege in das endoplasmatische Reticulum	106

5.1.5	<i>Tail-anchored</i> Proteine	106
5.1.6	Endoplasmatisches Reticulum – eine Frage der Form?	108
5.2	Mutantenuntersuchungen	109
5.3	Pex16p-Orthologe	111
5.3.1	Alignment ScPex3p	112
5.4	Peroxisomale Membranbiogenese	115
5.4.1	Drei Klassen peroxisomaler Membranproteine?	117
5.5	Pex3p-Komplexe	118
6	Ausblick	123
	Literaturverzeichnis	125
A	Proteintabellen	141
A.1	Autophagocytose	143
A.2	Peroxine	147
B	Ergebnis-Nachtrag	151
C	Klonierungsschemata	157
D	Plasmidkarte	159
	Danksagung	160