

A Proteintabellen

In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem Mutanten des Autophagocytoseweges und des *cytoplasm to vacuole transport* untersucht. Die folgenden Seiten geben eine Übersicht über die an der Autophagocytose oder am *cytoplasm to vacuole transport* beteiligten Proteine. Die Tabelle enthält Informationen zur Lokalisation, zu Interaktionspartnern und – wenn bekannt – die Funktion des Proteins. Die Daten wurden aus den in der Einleitung im Abschnitt 1.3 ab Seite 7 zitierten Publikationen, der *Yeast proteome database* [62] und der *Saccharomyces Genome Database* [22] zusammengestellt.

Abschnitt A.2 auf Seite 147 gibt einen Überblick über Proteine die für die Peroxisomenbiogenese essentiell sind. Diese Proteine werden als Peroxine bezeichnet. Bisher wurden 32 Peroxine identifiziert. Die Tabelle enthält Informationen zu Lokalisation und Funktion der Proteine. Die letzte Spalte enthält eine Auflistung der Interaktionspartner und die Zusammensetzung der bekannten peroxisomalen Proteinkomplexe. Die Informationen wurden den in Abschnitt 1.4 ab Seite 15 zitierten Publikationen, der *Yeast proteome database* [62] und der *Saccharomyces Genome Database* [22] entnommen.

A.1 Autophagocytose

Protein	Topologie/ Lokalisation	Funktion	Interaktionen
Atg1p	Cytoplasma	Serin-/Threoninkinase Tor-Signalkaskade	Atg13p, Atg17p, Atg11p, Ctk3p
Atg2p	peripheres Membranprotein pre-vakuoläres Kompartiment notwendig für Pexophagocytose	erforderlich für Atg9p-Lokaliasation	Lsm8p, Atg8p, Atg18p
Atg3p	Cytoplasma	E2-ähnliches Enzym Ubiquitine ähnliche Konjugation von Atg8p an Phosphatidylethanolamin	Atg12p, Atg7p, Atg8p, Bzz1p, Kap111p, Nsp116p
Atg4p	Cytoplasma Mikrotubuli assoziiert	Cystein-Endopeptidase Spaltet Atg8p nach AS 116 spaltet Atg8p-PE-Konjugat	Atg8p, Tub1, Tub2p, Cdc15p,
Atg5p	autophagosomale Membran	Bildung von Konjugaten mit Atg12p	Atg12p, Atg16p, Fet3p, ...
Atg7p	Cytoplasma Membranperipherie	E1-ähnliches Enzym Ubiquitine ähnliche Konjugation von Atg12p an Atg5p und PE an Atg8p	Atg12p, Atg3p, Atg8p, Atg10p, Atg7p, Ydr412p, Vid27p, Sso2p, Ris1p
Atg8p	Membran cytoplasmatisch Mikrotubuli assoziiert	ubiquitinähnliche Konjugation an PE Assemblierung der autophagosomalen Membran Erweiterung des Autophagosoms	Atg4p, Atg7p, Bet1p, Nyv1p, Vam3p, Atg3p, Yol083p
Atg9p	integrales Membranprotein	erforderlich für die Lokalisation von Atg2p	Atg2p, Ylr065p, Tif5p
Atg10p	Cytoplasma	E2-ähnliches Enzym für die Konjugation von Atg12p and Atg5p	Atg7p, Atg12p, Jsn1p
Atg11p	peripheres Membranprotein prä-vakuoläres Kompartiment	<i>cvt</i> -spezifisch für Pexophagocytose notwendig	Pcf11p, Dam1p, Atg1p, Atg12p

Protein	Topologie/ Lokalisation	Funktion	Interaktionen
Atg12p	Autophagosom Lysosom	wird über ubiquitinähnliche Konjugation kovalent an Atg5p gebunden	Atg7p, Atg5p, Atg3p, Atg16p, Atg10p, Atg17p, Sec18p, Kap124p, ...
Atg13p	Membran assoziiert	Interaktion von Atg13p mit Atg1p ist wichtig für Tor-Signalweg	Atg1p, Pup2p, Sec35p, Ynl086p, Fur1p, Vac8p
Atg14p	peripheres Membranprotein	Autophagocytose-spezifische Komponente des PI 3-Kinase-Komplexes	Vps30p, Ser3p, Cdc70p, Vma1p
Atg15p	integrales Membranprotein ER, Lysosom	putative Lipase	Isc1p
Atg16p	Membran assoziiert	stabilisiert Atg12p-Atg5p Konjugate durch Bildung großer multimerer Komplexe	Atg12p, Atg5p, Mec3p, Atg16p, Smt3p, Ste4p, Yfl040p, Kap95p, Nup1p
Atg17p	Cytoplasma	Aktivierung der Atg1p-Protein-Kinase autophagocytosespezifisch nicht erforderlich für <i>cvt</i>	Atg1p, Atg17p, Atg24p, Vam7p, Sec35p, Sec38p, Vps2p, Vps71p, ...
Atg18p	vakuoläre Membran	bindet Phosphoinositol beteiligt an Autophagocytose, Pexophagocytose und <i>cvt</i>	Atg2p, Lys14p, Sbe22p, Ycl063p, Yml059p, Bio3p, Gis3p, Adh1p, ...
Atg19p	cytoplasmatisch peripheres Membranprotein Vakuole	spezifischer Rezeptor für <i>cvt</i> -Weg nicht erforderlich für Autophagocytose oder Pexophagocytose	Kin1p, Laz4p, Tfb1p, Trs33p, Ume6p, Sog2p, Ams1p, Bzz1p, Glr1p, ...
Atg20p	prä-vakuoläre Struktur	enthält PX-Domäne ¹ -Domäne ² für Autophagocytose nicht erforderlich	Atg17p, Atg24p, Nip100p, Rrn10p, Sap155p
Atg21p	Cytoplasma	bindet Phosphoinositol	

¹*Phox* homology

²Phosphoinositol bindende Domäne

Protein	Topologie/ Lokalisation	Funktion	Interaktionen
Atg22p	vakuoläre Membran	Homology zu Permeasen reduzierter Abbau von <i>apg</i> -Vesikeln in <i>atg22</i> -mutanten	Ser3p, Stb5p, Ymr009p
Atg23p	integrales Membranprotein	unbekannt	
Atg24p	Membranprotein prä-vakuoläre Struktur	enthält PX-Domäne nicht essentiell für Autophagocytose	Atg17p, Atg20p, Ypt6p, Swf1p, Chk1p, Snx41p
Atg26p	Cytoplasma	Sterol-3- β -Glycosyltransferase	Mrpl9p, Mrpl16p
Atg27p	Membranprotein	Proteinkinaserregulation	Sap4p
Cvt3p	unbekannt	nicht erforderlich für Autophagocytose	
Prb1p	Lysosom	Serine Protease Abbau von Proteinen in der Vakuole	Ypk2p, Cbk1p, Pbn1p, Lsm1p, Sec27p, Cdc53p, ...
Vps30p	periphere vakuoläre Membran prä-vakuoläres Kompartiment	PI 3-Kinase Komplex erforderlich für <i>atg</i> ³ -, <i>cvt</i> ⁴ - und <i>vps</i> ⁵ -Weg	Atg14p, Crm1p, Vps38, Vps34, Vps15p, Ypt6p, Ric1p, Ste50p
Vps41p	Lysosom, Endosom	erforderlich für das Docking bei homo- typischer Vakuolenfusion Rab-Guaninnukletidaustauschfaktor ⁶	Vps39p, Vam5p, Vam6p, Vam8p, Vam9p, Ypt6p, Ypt7p, Apl5p, Vps16p, ...
Vps45p	Golgi-Apparat, Cytosol	Sec1p-Homologes bindet ungefaltete Proteine	Sec17p, Ykt6p, Vt1p, Tlg1p, Tlg2p, Pep12p, ...
Tor1p	Plasmamembran, Vakuole, Endosom, Golgi-Apparat	Phosphoinositol-3-Kinase Glycogen-Stoffwechsel Rho-Signalweg Celcyklusregulation	Bik1p, Dal80p, Dal81p, Dal82p, Msl5p, Gat1p ... Tor1p-Komplex mit Lst8p und Kog1p

³Autophagocytose

⁴*cytoplasm to vacuole transport*

⁵*vacuolar protein sorting*

⁶*guanyl-nucleotide exchange factor* (GEF)

Protein	Topologie/ Lokalisation	Funktion	Interaktionen
Tor2p	Plasmamembran, Vakuole cytosolische Vesikel	Phosphoinositol-3.Kinase Glycogen-Metabolismus Stressantwort Cellzyklusregulation ...	Pkc1p, Fpr1p, Plc1p, Bik1p, ... im Tor1-Komplex statt Tor1p mit Lst8p und Kog1p, Tor2-Komplex aus Avo1p, Avo2p, Tsc11p und Lst8p
Vac8p	Vakuole	erforderlich für cvt-Weg und Mikroautophagocytose, für Makroautophagocytose nicht essentiell	Atg13p, End7p, Cdc73p, Vab2p, Vab36p, Pbr2p, Rfc2p, Gcd7p, Jsn1p, Ylr254cp, Ykl061wp
Tlg2p	Golgi-Apparat, Endosom	Syntaxin-Homologes t- und v-SNARE ⁷ cvt-spezifisch	Tlg1p, Arl1p, Arl3p, Bzz1p, Ypt6p, Sec17p, Vti1p, Vma2p, Vps45p, Spc24p, Ric1p, Swf1p, Nup53p, ...
Ypt7p	Membranprotein, Endosom, Vakuole	Golgi-Vakuole-Transport, Vesikeltransport GTPase	Vam6p, Vam7p, Ypt6p, Vps41p, ... Gdi1p-assoziiertes Komplex Tpk3p-assoziiertes Komplex
Vam3p	integrales Membranprotein, Vakuole	Transport vom Golgi- Apparat zur Vakuole, t-SNARE	Atg8p, Sec17p, Vti1p, Ytk6p, ... vakuolärer v-t-SNARE-Komplex, vakuolärer cis-SNARE-Komplex, ternärer t-SNARE-Komplex
Vam6p	Vakuole	Docking bei homotypischer Vakuolenfusion Rab-GEF	Vps41p, Ypt6p, Ypt7p, Lsm7p, Pep5p, Vps16p, Arl1p, Arl3p, Ric1p

Tabelle A.1: In der vorliegenden Tabelle sind alle bekannten an Autophagocytose oder *cytoplasm to vacuole transport* beteiligten Proteine mit ihrer Lokalisation sowie ihren Funktionen und bekannten Interaktionen aufgelistet. Die Tabelle wurde mit Informationen aus der *Yeast proteome database* [62], der *Saccharomyces genome database* [22] und aus den Publikationen die in der Einleitung im Abschnitt 1.3 (S. 7) aufgeführt wurden erstellt.

⁷ *target-, vesicle- soluble NSF attachment protein receptor*

A.2 Peroxine

Protein	Topologie/ Lokalisation	Charakterisierung/Funktion	Interaktionen/ Komplex mit
Pex1p	peroxisomale Membran, Cytosol	ATPase der AAA-Familie	Pex6p, Cne1p
Pex2p	mitochondriale und peroxisomale Membran	Ring-Zinkfingerprotein	Kap124p, Mec3p, Rpp1bp
Pex3p	integrales peroxisomales Membranprotein	an Membranbiogenese beteiligt	Pex19p, Noc3p, Knh1p
Pex4p	peripheres Membranprotein, intraperoxisomal	E2-ähnliches Ubiquitin-Konjugierendes Enzym, bindet PI3P	Pex22p, Dml1p, Knh1p, Fks1p, Skn1p
Pex5p	Cytosol, intra-peroxisomal peripheres Membranprotein	PTS1-Rezeptor	Cat2p, Mdh3p, Pox1p, Pex7p, Pex8p, Pex13p, Pex14p, Eci1p, Knh1p, Skn1p peroxisomaler Importkomplex aus Pex8p, Pex13p, Pex14p, Pex17p, Pex2p, Pex10p, Pex12p
Pex6p	integrales peroxisomales Membranprotein, Cytosol	ATPase der AAA-Familie	Pex1p, Lsm8p, Knh1p, Chs1p, Chs7p, Cts1p, Kre11p
Pex7p	Cytosol, peroxisomale Matrix	enthält 5 WD40-B Motive PTS2-Rezeptor	Fox3p, Pex5p, Pex13p, Pex14p, Pex17p, Pex18p, Pex21p, Sec6p, ... Pex7p-assoziiierter Komplex
Pex8p	intraperoxisomales peripheres Membranprotein		Pex5p, Lsm2p/ peroxisomaler Importkomplex
Pex9p	kein Orthologes in <i>S. cerevisiae</i>		
Pex10p	integrales peroxisomales Membranprotein	Ring-Zinkfingerprotein autoubiquitiniert	Pex12p, Ydr332wp peroxisomaler Importkomplex

Protein	Topologie/ Lokalisation	Charakterisierung/Funktion	Interaktionen/ Komplex mit
Pex11p	integrales peroxisomales Membranprotein	Peroxisomen Teilung	Sua7p
Pex12p	integrales peroxisomales Membranprotein	Ring-Zinkfingerprotein	Pex5p, Pex10p, Pex13p, Pex14p/ peroxisomaler Importkomplex
Pex13p	integrales peroxisomales Membranprotein	Docking-Komplex	Pex5p, Pex14p, Pex17p, Pex7p, Pex12p, Pex21p, Knh1p, Jsn1p, ... peroxisomaler Importkomplex
Pex14p	ER, intra- und extraperoxisomales peripheres Membranprotein	Docking-Komplex	Cta1p, Lys1p, Dcl1p, Pex5p, Pex7p, Pex13p, Pex14p, Pex17p, Sec38p, ... peroxisomaler Importkomplex
Pex15p	ER, integrales peroxisomales Membranprotein		Ski7p, Rrd1p, Rad2p, Yur1p, Las21p
HsPex16p	integrales peroxisomales Membranprotein	peroxisomale Membranbiogenese	(kein Orthologes in <i>S. cerevisiae</i>)
Pex17p	intra-peroxisomales peripheres Membranprotein	erweiterter Docking-Komplex	Pex5p, Pex7p, Pex13p, Pex14p, Jsn1p peroxisomaler Importkomplex
Pex18p	peroxisomal, Cytosol	bindet Pex7p-Fox3p-Komplex, importabhängige Mono- und Diubiquitinierung und angebaut	Pex7p, Pex13p, Fox3p
Pex19p	Cytosol peripher an der peroxisomalen Membran farnesyliert	peroxisomale Membranbiogenese	Cat2p, Pex3p, Knh1p, Kap124p, ... Hrr25p-assoziiierter Komplex Hym1p-assoziiierter Komplex Pat1p-assoziiierter Komplex Yer066cp-assoziiierter Komplex Yku70p-assoziiierter Komplex

Protein	Topologie/ Lokalisation	Charakterisierung/Funktion	Interaktionen/ Komplex mit
Pex20p	Identifiziert in <i>N. crassa</i> und <i>Y. lipolytica</i> , Orthologes zu Pex18p/Pex21p in <i>S. cerevisiae</i>		
Pex21p	peroxisomal	bindet Pex7p-Pot1p Komplex, redundant zu Pex18p	Pex7p, Pex13p, Pex14p, Pot1p, Yag6p, Mga1p, Sif2p, ...
Pex22p	peroxisomale Membran	Membranbindung von Pex4p	Pex4p, Kre6p, Chs1p, Nup1p
Pex23p	kein Orthologes in <i>S. cerevisiae</i>		
Pex24p	kein Orthologes in <i>S. cerevisiae</i> (s. auch Pex28p)		
Pex25p	peroxisomales Membranprotein	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten	Hpa3p
Pex26p	kein Orthologes in <i>S. cerevisiae</i>		
Pex27p	peroxisomale Membran	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten	
Pex28p	integrales peroxisomales Membranprotein	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten Ähnlichkeit zu Pex29p und Yl ⁸ Pex24p	
Pex29p	integrales peroxisomales Membranprotein	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten Ähnlichkeit zu Pex28p und YlPex24p	Pex30p, Ser3p, Soh1p, Ydr018cp,
Pex30p	integrales peroxisomales Membranprotein	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten agiert nach Pex28p/Pex29p redundant zu Pex31p	Pex29p, Pex30p, Pex31p, Srp1p, Yop1p, Jsn1p, Yip1p, Kap60p, Nup53p, Ydl089wp, Ygr026wp

⁸ *Yarrowia lipolytica*

Protein	Topologie/ Lokalisation	Charakterisierung/Funktion	Interaktionen/ Komplex mit
Pex31p	integrales peroxisomales Membranprotein	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten agiert nach Pex28p/Pex29p redundant zu Pex30p und Pex32p	Pex30p, Yop1p, Rna15p
Pex32p	integrales peroxisomales Membranprotein	veränderte Anzahl und Größe von Peroxisomen in Mutanten agiert nach Pex28p/Pex29p redundant zu Pex31p	Ser3p

Table A.2: In der Tabelle sind alle bisher bekannten Peroxine aufgelistet. Informationen zu Lokalisation, Funktion und Interaktionen wurden der *Yeast Proteome Database* [62], der *Saccharomyces Genome Database* [22] und den in der Einleitung im Abschnitt 1.4 (S. 15) zitierten Publikationen entnommen.

B Ergebnis-Nachtrag

Im folgenden sind die Untersuchungsergebnisse aller in der vorliegenden Arbeit behandelten Autophagocytosemutanten und der Mutanten des *cytoplasm to vacuole transport* dargestellt. Nähere Erläuterungen enthält Abschnitt 4.1.4 auf Seite 73.

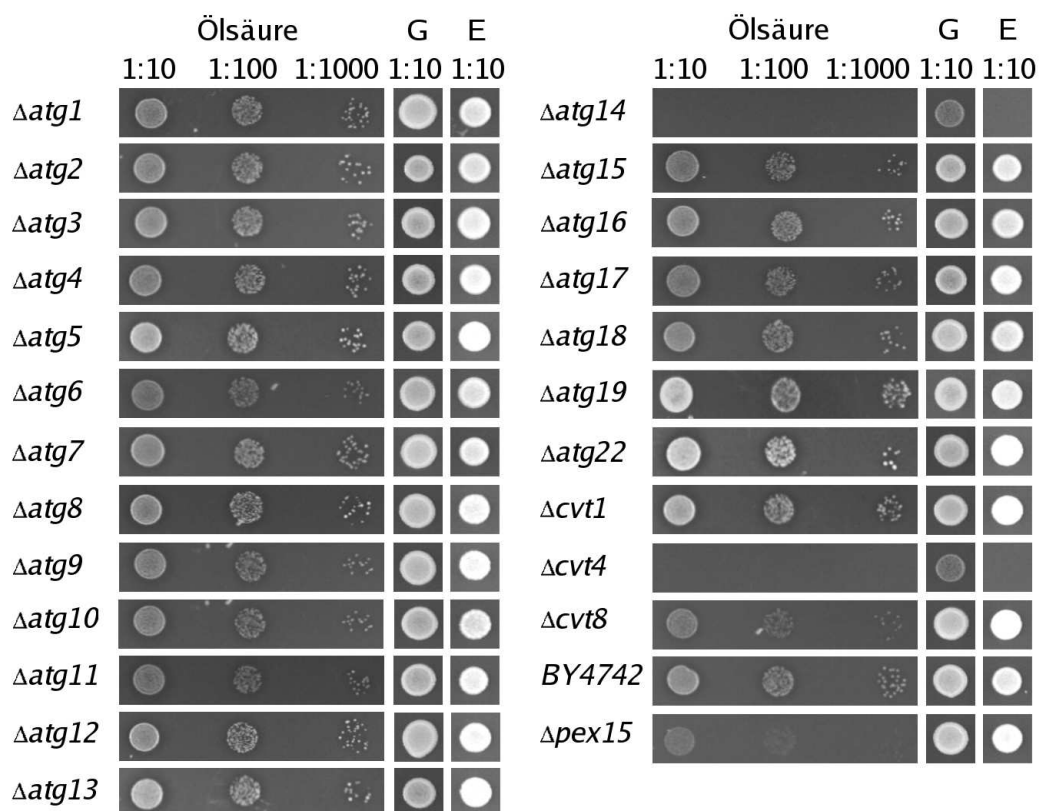


Abbildung B.1: Wachstum auf Ölsäure – *atg*-Mutanten: Die Zellen ($OD_{600}=1$) wurden 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und je $2\mu\text{l}$ auf die angegebenen Festmedien aufgetragen. Die Zellen wurden dann für 3 (Glucosemedien-G), 5 (Ethanolmedien-E) bzw. 6 Tage (Ölsäuremedien) bei 30°C inkubiert.

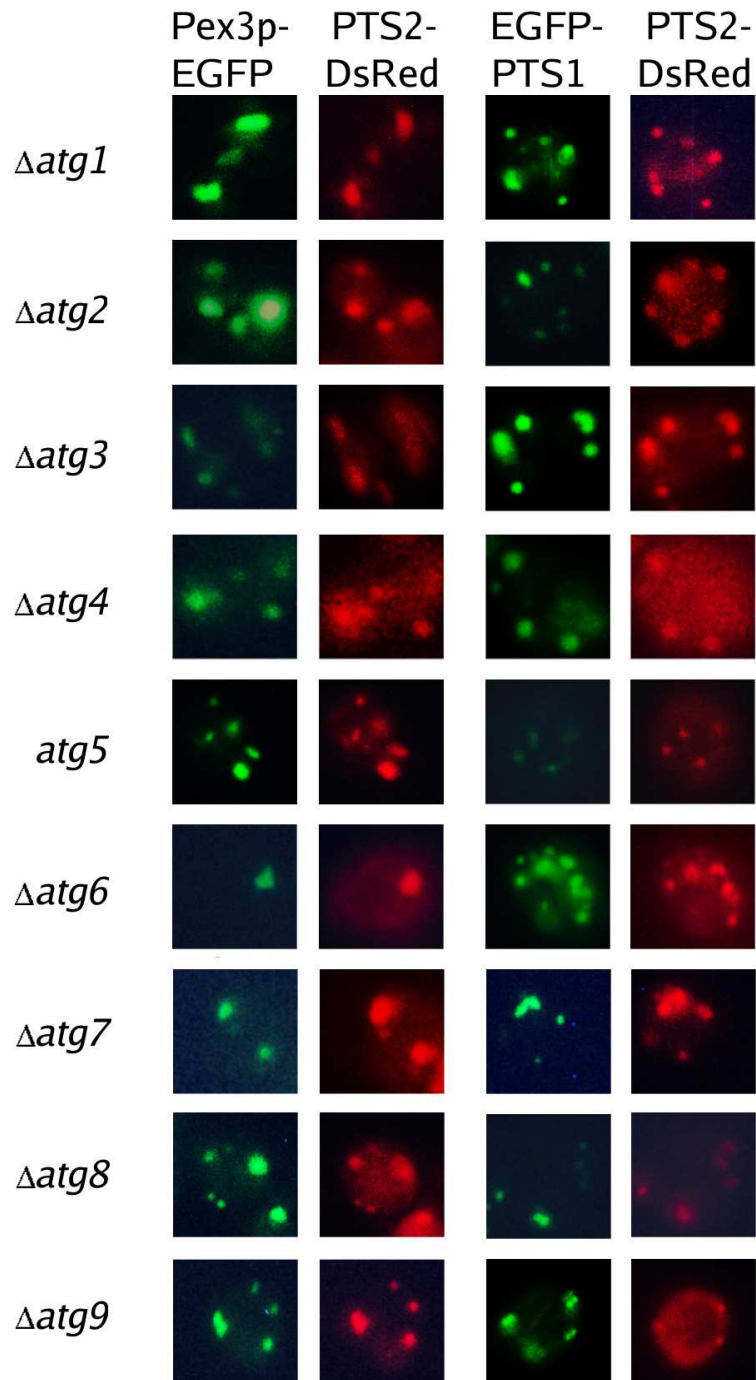


Abbildung B.2: Fluoreszenzaufnahmen von atg Mutanten Teil 1: Gezeigt sind Aufnahmen von einzelnen Zellen, die entweder Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed exprimierten.

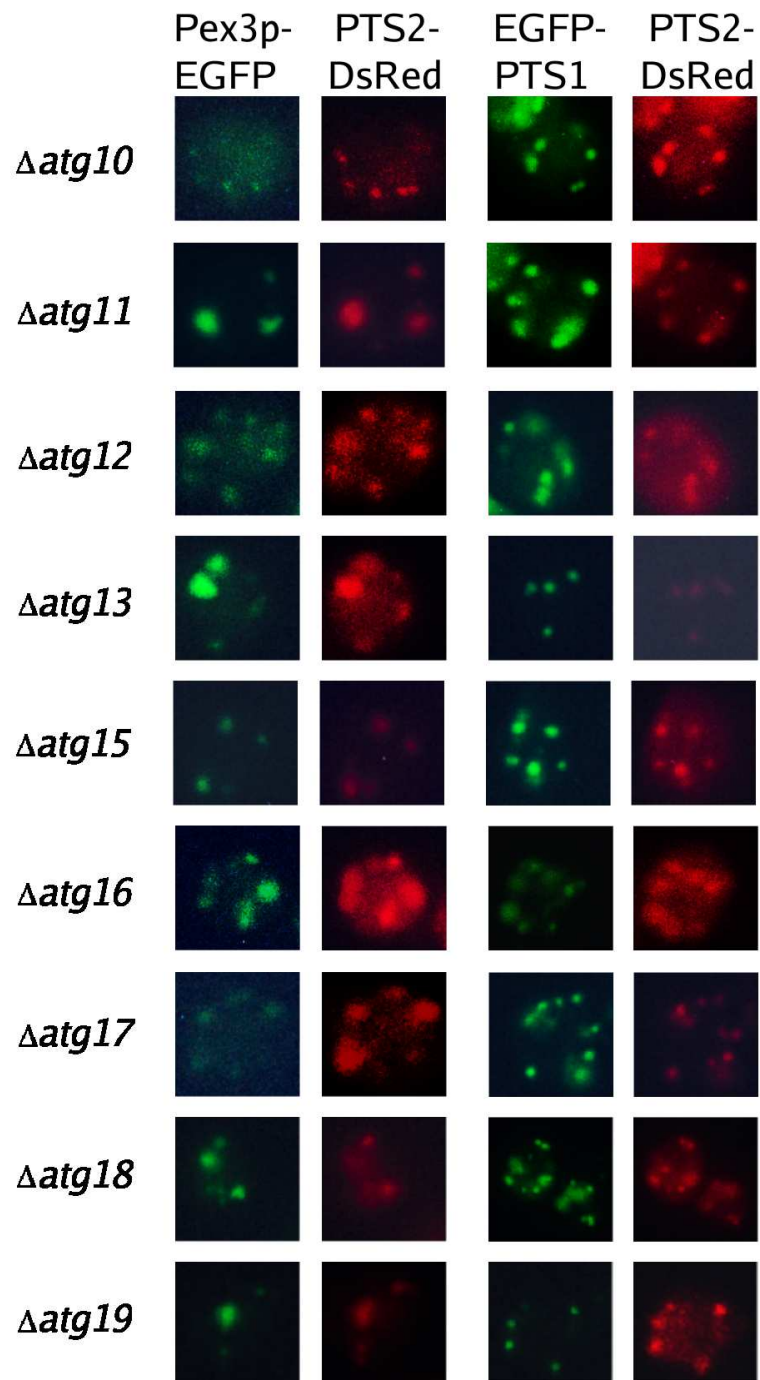


Abbildung B.3: Fluoreszenzaufnahmen von atg Mutanten Teil 2: Gezeigt sind Aufnahmen von einzelnen Zellen, die entweder Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed exprimierten.

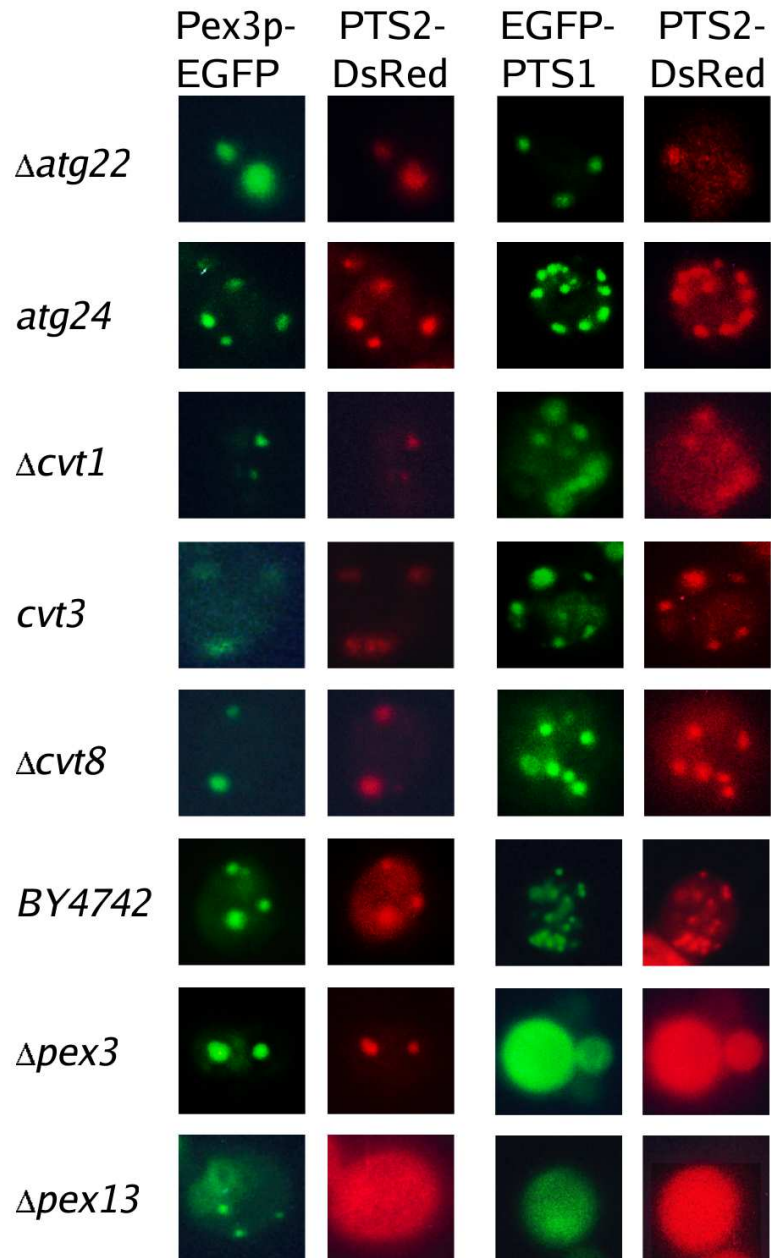


Abbildung B.4: Fluoreszenzaufnahmen von atg Mutanten Teil 3: Gezeigt sind Aufnahmen von einzelnen Zellen, die entweder Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed exprimierten.

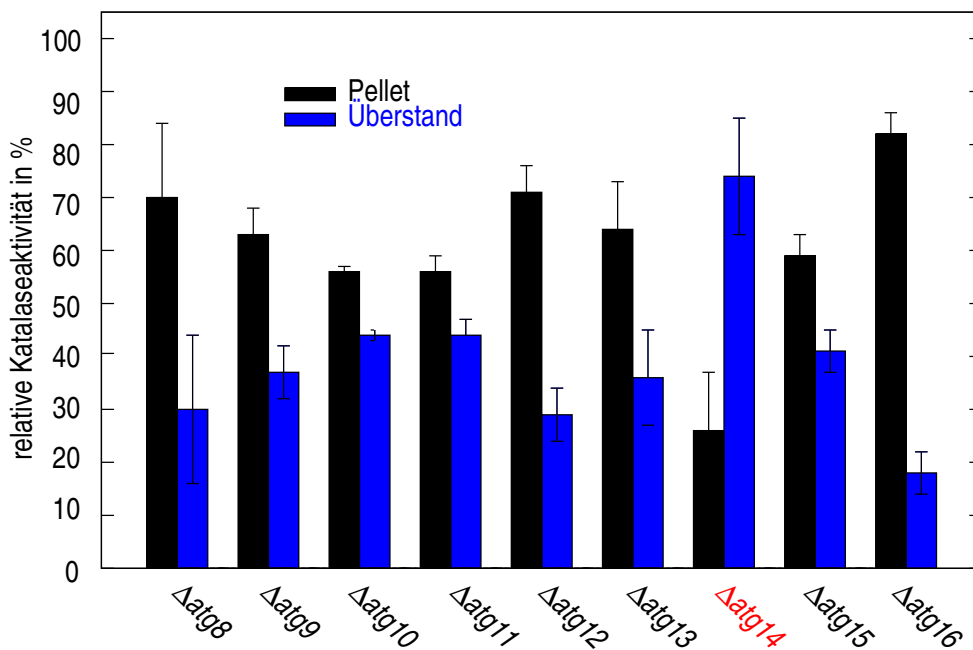
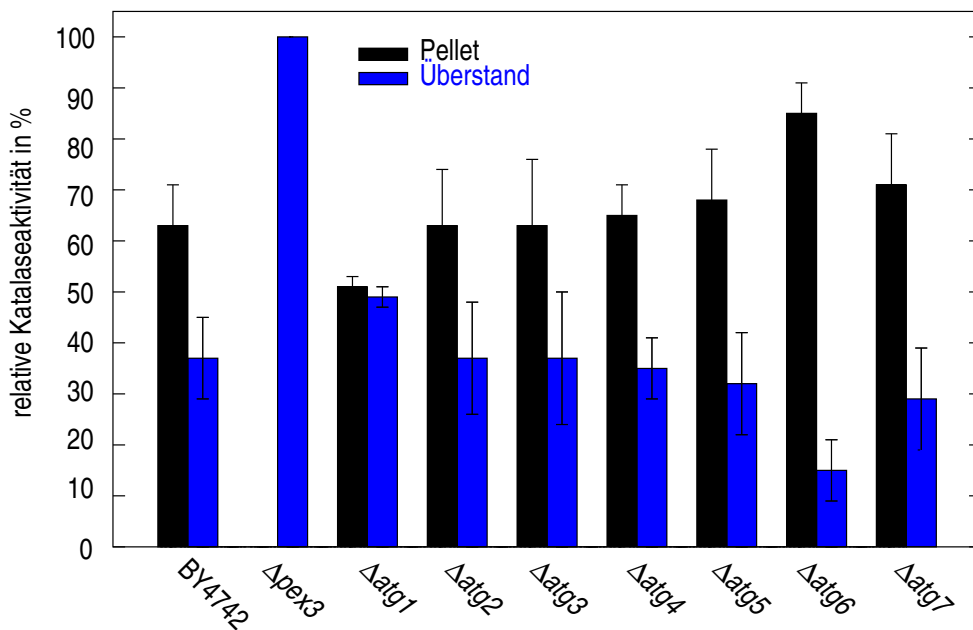


Abbildung B.5: Subzelluläre Fraktionierung *atg*-Mutanten Teil 1: Die Abbildung zeigt die relativen Katalaseaktivitäten in vergleichbaren Mengen Pellet und Überstand einer Zentrifugation des PNS bei 25000g für 10 Minuten. *atg*-Mutanten bei denen die Aktivität im Überstand höher war als die Aktivität im Pellet sind rot gekennzeichnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n=4).

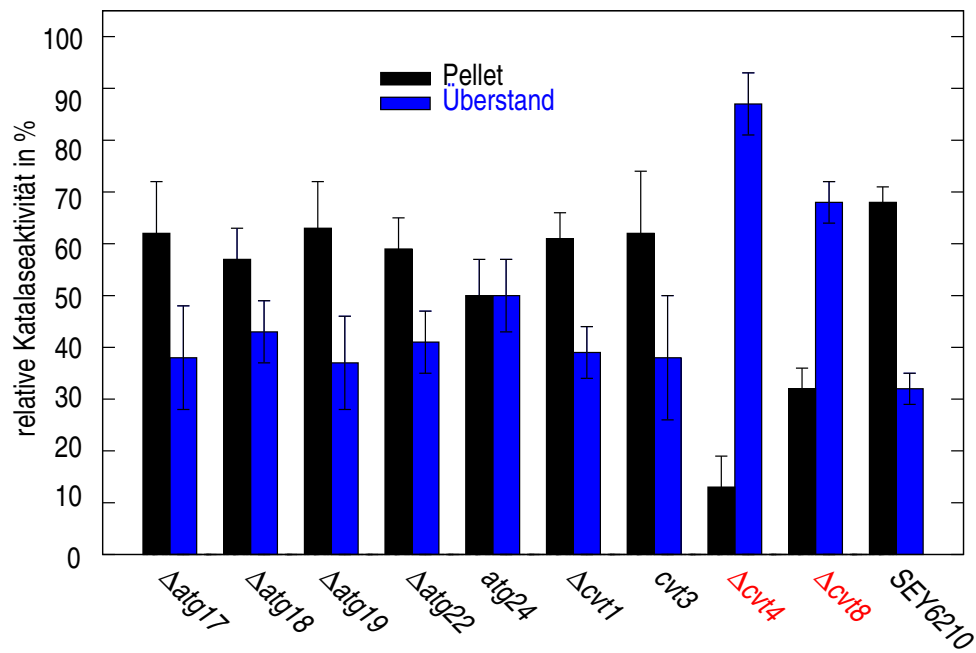


Abbildung B.6: Subzelluläre Fraktionierung *atg*-Mutanten Teil 2: Die Abbildung zeigt die relativen Katalaseaktivitäten in vergleichbaren Mengen Pellet und Überstand einer Zentrifugation des PNS bei 25000g für 10 Minuten. *atg*-Mutanten bei denen die Aktivität im Überstand höher war als die Aktivität im Pellet sind rot gekennzeichnet. *cvt3* und *atg24* sind Originalmutanten aus der Arbeitsgruppe von D.J. Klionsky. Alle anderen Mutanten sind Deletionsmutationen des Wildtypstamms BY4742 (EUROFAN-Projekt) Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n=4).

C Klonierungsschemata

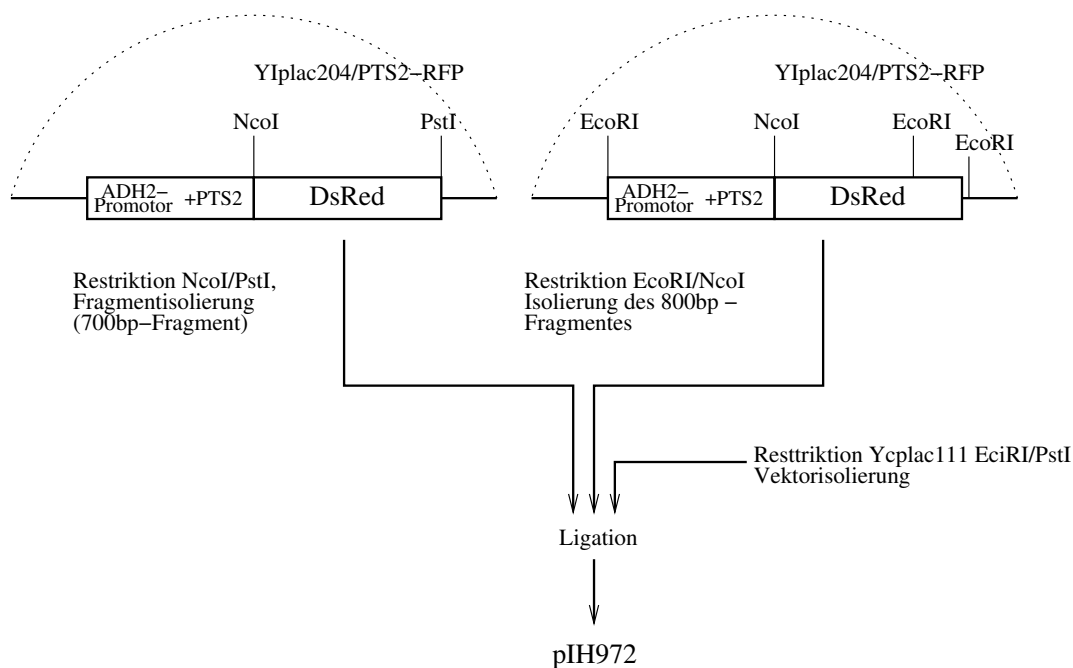


Abbildung C.1: Klonierungsschema – PTS2-DsRed: In einem Reaktionsansatz wurde das Plasmid YIplac204/PTS2-DsRed [145] mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und PstI behandelt. In einem anderen Reaktionsansatz wurde das gleiche Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und NcoI behandelt. Aus dem ersten Reaktionsansatz wurde das entstandene 700bp-Fragment isoliert. Aus dem zweiten Reaktionsansatz wurde das neben anderen Bruchstücken entstandene 800bp-Fragment isoliert. Der Vektor YCplac111 wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI behandelt, der Vektor isoliert und mit den Fragmenten des Vektors YIplac204/PTS2-DsRed in einer Dreifachligation verbunden (pIH972).

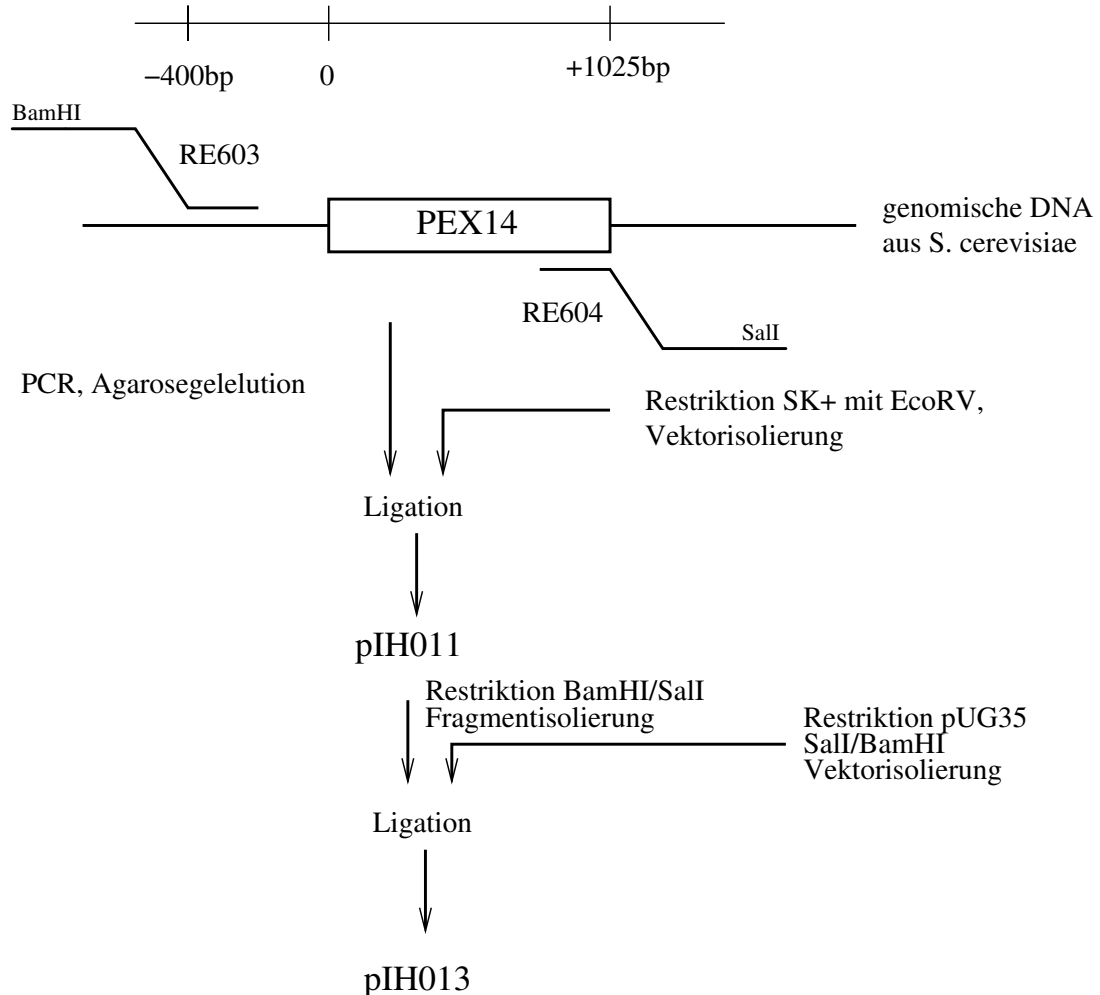


Abbildung C.2: Klonierungsschema – Pex14p-EGFP: Aus genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit den Primern RE603 und RE604 der *PEX14*-ORF und 400bp aus dem *PEX14*-Promotor amplifiziert und das resultierende PCR-Fragment mit dem EcoRV behandelten SK+-Vektor ligiert (pIH011). Das Plasmid pIH011 und der Zielvektor pUG35 wurden mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI behandelt, der geschnittene Vektor und das 1425bp-Fragment des Plasmids pIH011 isoliert und beides miteinander ligiert (pIH013).

D Plasmidkarte

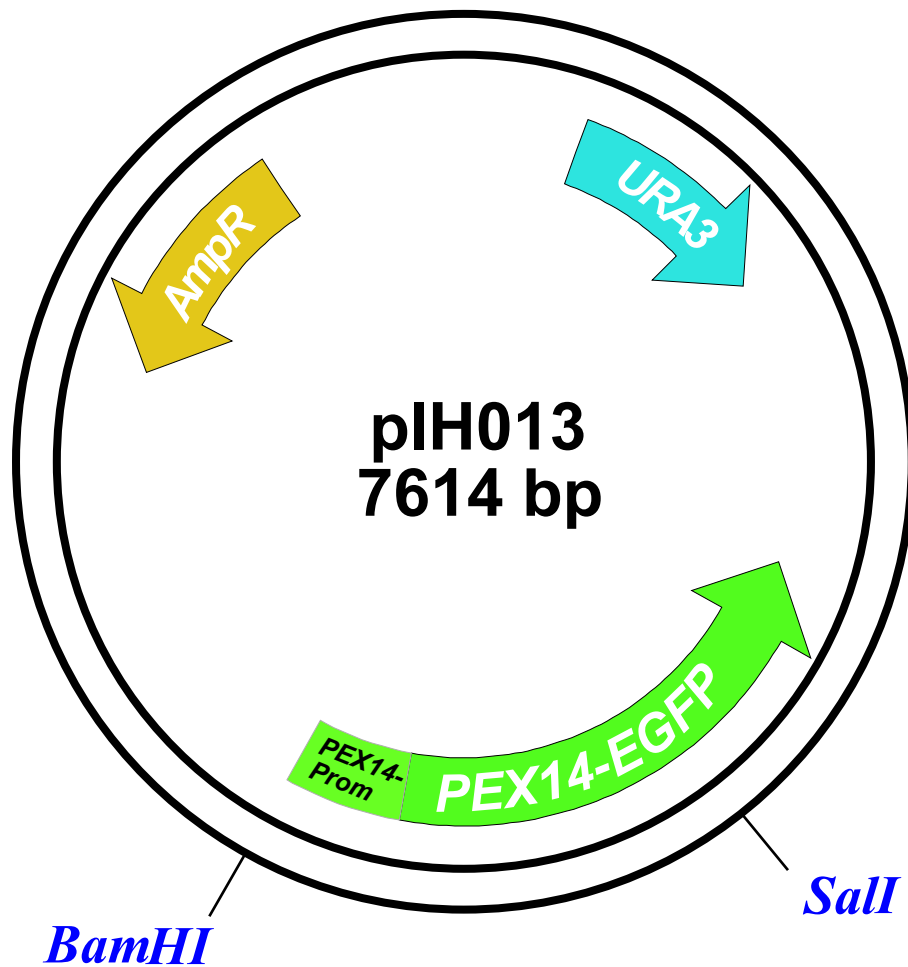


Abbildung D.1: Plasmidkarte pIH013: Das Plasmid kodiert für das Fusionsprotein Pex14p-EGFP. Die Expression erfolgt unter dem *PEX14*-Promotor. Das Basisplasmid ist pUG35 [106]. Es sind die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen angegeben, mit Hilfe derer die Klonierung durchgeführt wurde.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich insbesondere meinem Lebensgefährten, Frank Meißner, für seine Unterstützung in den letzten Jahren und vor allem während der Zeit des Schreibens danken. Außerdem möchte ich mich hiermit für seine Hilfe bei der Bewältigung der vielen kleinen und großen technischen Probleme und für das Korrekturlesen der Arbeit herzlich bedanken.

Herrn Prof. R. Erdmann danke ich für die Betreuung der Arbeit und die vielen aufschlussreichen und interessanten Gespräche und Diskussionen der letzten Jahre.

Herrn PD Dr. W. Schuster danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Tanja Schievelbusch, Andre Halbach, Dr. Jörg Eckert und Annette Schell-Steven möchte ich auf diesem Weg zum einen für die nette Arbeitsatmosphäre und zum anderen für das Korrekturlesen der Arbeit herzlich danken.

Für fachliche Ratschläge, Diskussionen, Hinweise und die geduldige Beantwortung meiner vielen Fragen danke ich außerdem Herrn Prof. R. Rottensteiner.

Bei Katja Rosenkranz möchte ich mich für die Hilfe bei der Komplexisolierung und der Blauen-Nativen Gelelektrophorese bedanken.

Monika Bürger danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Bei Gisela Wendel und Uta Ricken bedanke ich mich für die Betreuung der Stammsammlung und die Erstellung von Hefestämmen.

Elisabeth Becker danke ich hiermit für die Orientierungshilfen nach dem Umzug nach Bochum und die vielen kleinen Hilfestellungen im Laboralltag.

Außerdem möchte ich den Sekretärinnen Frau Scharf, Frau Witt-Reinhardt, Frau Peuker und Frau Wiese für Ihre Hilfe bei Einstellungsverfahren, Formularen, Anträgen und Bestellungen vielmals danken.

Zum Schluss möchte ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe R. Erdmann aus Berlin und Bochum für ihre Hilfe und die Beantwortung von Fragen danken.