

# **Identifizierung und Funktionsanalyse von peroxisomalen Proteinen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**angefertigt am  
Institut für Biochemie**

vorgelegt von  
**Katja Nau**  
aus Morbach

**Berlin 2002**

Erster Gutachter: Herr Prof. Dr. Ralf Erdmann

Zweiter Gutachter: Frau PD Dr. Shiao Li Oei

Tag der Disputation: 4. September 2002

## **Teile dieser Arbeit wurden unter den genannten Titeln bereits publiziert:**

Brian V. Geisbrecht, Dai Zhu, Kerstin Schulz, Katja Nau, James C. Morrell, Michael T. Geraghty, Horst Schulz, Ralf Erdmann, and Stephen J. Gould (1998)

Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta^3, \Delta^2$ -Enoyl-CoA Isomerase.

Journal of Biological Chemistry 273 (50), 33184-33191

Jacob M. Jones, Katja Nau, Michael T. Geraghty, Ralf Erdmann, and Stephen J. Gould (1999)

Identification of Peroxisomal Acyl-CoA Thioesterase in Yeast and Humans.

Journal of Biological Chemistry 274 (14), 9216-9223

Brian V. Geisbrecht, Kerstin Schulz, Katja Nau, Michael T. Geraghty, Horst Schulz, Ralf Erdmann, and Stephen J. Gould (1999)

Preliminary Characterization of Yor180Cp: Identification of a Novel Peroxisomal Protein of *Saccharomyces cerevisiae* involved in Fatty Acid Metabolism.

Biochemical and Biophysical Research Communications 260, 28-34

Heike Schäfer\*, Katja Nau\*, Albert Sickmann, Ralf Erdmann, and Helmut E. Meyer (2001)

Identification of Peroxisomal Membrane Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by Mass Spectrometry.

Electrophoresis 22, 2955-2968 \* gleichberechtigte Erstautoren

Katja Nau\*, Heike Schäfer\*, Helmut E. Meyer, and Ralf Erdmann (2002)

Proteomic Approach to the Identification of Peroxisomal Proteins.

In Vorbereitung \* gleichberechtigte Erstautoren

## **Angefertigte Poster:**

Katja Nau and Ralf Erdmann

A Reverse Genetic Approach to Identify Peroxisomal Proteins from *Saccharomyces cerevisiae*

Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, GBM, 2000, München

Heike Schäfer, Katja Nau, Albert Sickmann, Ralf Erdmann, and Helmut E. Meyer

Analysis of Peroxisomal Membrane Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* using 1D-SDS-Gel Electrophoresis combined with LC-MS/MS

ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2001, Chicago

Heike Schäfer, Katja Nau, Albert Sickmann, Ralf Erdmann, and Helmut E. Meyer

Identification of Peroxisomal Membrane Proteins

Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, GBM, 2001, Bochum

Katja Nau, Heike Schäfer, Helmut E. Meyer, and Ralf Erdmann

The Proteome of the Yeast Peroxisomal Membrane

ACB, 2001, USA

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen	2
1.2	Die <i>PEX</i> -Gene und ihre Genprodukte, die Peroxine	3
1.3	Biogenese von Peroxisomen	5
1.4	Peroxisomale Signalsequenzen und ihre Rezeptoren	6
1.5	Importkomponenten an der peroxisomalen Membran	9
1.6	Die $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren	11
1.7	Porine	12
1.8	Fluoreszenzproteine als Reporterproteine	12
1.9	Der reverse genetische Ansatz	13
1.10	Zielsetzung dieser Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Chemikalien	15
2.2	Mikroorganismen	16
2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	16
2.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3	Antiseren	17
2.4	Vektoren und Plasmidkonstrukte	18
2.4.1	Vektoren	18
2.4.2	Plasmidkonstrukte	18
2.5	Analytische Methoden	19
2.5.1	Bestimmung von Enzymaktivitäten	19
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.6	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.6.1	Medien	20
2.6.2	Wachstum auf Festagarplatten	20
2.6.3	Anzucht für biochemische Analysen	20
2.7	Aufschluss von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.8	Subzelluläre Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation	21
2.9	Sedimentation von Organellen	22
2.10	Fraktionierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	22
2.11	Fraktionierung durch Accudenz-Dichtegradienten-Zentrifugation	23
2.12	Subperoxisomale Fraktionierung	23
2.13	Protein-Biochemische Methoden	24
2.13.1	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	24
2.13.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.13.3	Western Blotting und Immundetektion	25
2.13.4	Proteinfärbung	25
2.14	Massenspektrometrische Methoden	26
2.14.1	Analyse der "Massenfingerprints"	26
2.15	Elektrophysiologische Messungen	27
2.16	Molekularbiologische Methoden	28
2.16.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> zur DNA-Isolierung	28
2.16.2	Präparation $\text{CaCl}_2$ -kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	28
2.16.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	29
2.16.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	29
2.16.5	DNA-Restriktion	29
2.16.6	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.16.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	30
2.16.8	Alkalische Phosphatase-Behandlung	30
2.16.9	Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.16.10	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	30

2.16.11	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.16.12	Northern Blot-Analyse	34
2.16.13	Erstellung kompetenter Hefezellen und Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.16.14	Homologe Rekombination	35
2.16.15	Markierung des Pex11p mit TAP (Tandem Affinity purification)-Tag	35
2.16.16	Erzeugung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Deletionsmutanten	36
2.17	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	37
2.18	Sonstige bildgebende Verfahren	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Identifizierung potentieller peroxisomaler Proteine	38
3.2	Charakterisierung identifizierter Proteine	43
3.2.1	Die peroxisomalen Proteine Eci1p, Dci1p und Tes1p	43
3.2.2	Charakterisierung des Yor084wp	43
3.2.2.1	Identifizierung und Sequenzanalyse	43
3.2.2.2	Subzelluläre Lokalisation	45
3.2.2.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	49
3.2.2.4	Die Expression von YOR084W ist durch Ölsäure induzierbar	50
3.2.3	Charakterisierung des YEL020C	51
3.2.3.1	Identifizierung und Sequenzanalyse des YEL020C	51
3.2.3.2	Subzelluläre Lokalisation	54
3.2.3.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	56
3.2.4	Charakterisierung des YGL184C	57
3.2.4.1	Identifizierung und Sequenzanalyse	57
3.2.4.2	Subzelluläre Lokalisation	59
3.2.4.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	61
3.2.5	Yir034cp/Lys1p ist ein peroxisomales Protein	61
3.2.5.1	Sequenzanalyse	61
3.2.5.2	Subzelluläre Lokalisation	62
3.2.5.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	65
3.2.6	Ybl015wp/Ach1p ist in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert	66
3.2.6.1	Sequenzanalyse	66
3.2.6.2	Subzelluläre Lokalisation	67
3.2.6.3	Erstellung und Überprüfung einer Gendeletionsmutante des ACH1-Gens	70
3.2.6.4	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	71
3.2.7	Eine potentielle Serin/Threonin-Kinase konnte in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert nachgewiesen werden	72
3.2.7.1	Sequenzanalyse	72
3.2.7.2	Subzelluläre Lokalisation	75
3.2.7.3	Wachstumsanalysen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	76
3.2.8	Identifizierung mitochondrialer Proteine: Yor228cp	77
3.2.8.1	Sequenzanalyse	77
3.2.8.2	Subzelluläre Lokalisation	78
3.2.8.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	81
3.2.9	Ein mitochondrialer Transporter unter Peroxisomen	82
3.2.9.1	Subzelluläre Lokalisation	82
3.2.9.2	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	85
3.2.10	Das unbekannte Protein Yhr199cp	86
3.2.10.1	Sequenzanalyse	86
3.2.10.2	Subzelluläre Lokalisation	86
3.2.10.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	88
3.2.11	Die Acetyl-CoA-Synthetase, ACS1 ist nicht peroxisomal	89
3.2.11.1	Sequenzanalyse	89
3.2.11.2	Subzelluläre Lokalisation	91
3.2.11.3	Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	94
3.2.12	22 der identifizierten Proteine sind nicht in Peroxisomen lokalisiert	96

3.2.12.1	Die Triglycerid-Lipasen 1 (YKL140W) und 2 (YDR058C) sind mit Lipid-Partikeln assoziiert, nicht aber mit Peroxisomen.	96
3.2.12.2	Cytosolische Proteine: Faa1p/Ybr317cp	97
3.2.12.3	Sieben cytosolische Proteine	98
3.2.12.4	Sonstige subzelluläre Lokalisationen	100
3.2.12.5	Fünf Proteine mit unbestimmter Lokalisation	101
3.2.13	Pmp15p, Pmp17p und Pmp18p	103
3.2.14	Überblick	105
3.3	Untersuchungen zu Pex11p	106
3.3.1	Erstellung und Überprüfung von Gendeletionsmutanten der <i>PORIN</i> -Gene 1 und 2 und des <i>PEX11</i>	106
3.3.2	Subzelluläre Lokalisation	108
3.3.3	Elektrophysiologische Messungen an künstlichen Membranen	109
3.3.4	Erstellung und Überprüfung des TAP-Tags an <i>PEX11</i>	110
3.3.4.1	Der PEX11-TAP-Tag ist funktionell	111
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
4.1	Identifizierung von Proteinen	113
4.2	Funktionsanalyse neuer Proteine	114
4.2.1	Eci1p, Dci1p und Tes1p sind peroxisomal	114
4.2.2	Yor084wp	115
4.2.2.1	Yor084wp gehört zur Lipase-Esterase-Familie	115
4.2.2.2	Yor084wp ist ein peroxisomales Matrixprotein	115
4.2.2.3	Das YOR084W-Gen ist nicht essentiell für die Biogenese von Peroxisomen	116
4.2.2.4	Untersuchungen zur Funktion des Yor084wp im peroxisomalen Stoffwechsel	116
4.2.3	Yel020cp	117
4.2.3.1	Yel020cp ist ein peroxisomales Matrixprotein	117
4.2.3.2	Das YEL020C-Gen ist nicht essentiell für die Biogenese von Peroxisomen	118
4.2.3.3	Untersuchungen zur Funktion des Yel020cp im peroxisomalen Stoffwechsel	118
4.2.4	Ygl184cp	119
4.2.4.1	Ygl184cp ist in der peroxisomalen Membran lokalisiert	119
4.2.4.2	Untersuchungen zur Funktion des Ygl184cp im peroxisomalen Stoffwechsel	120
4.2.5	Yir034cp	120
4.2.6	Ybl015wp	121
4.2.6.1	Ybl015wp ist in Peroxisomen und in Mitochondrien lokalisiert	121
4.2.6.2	Untersuchungen zur Funktion des Ybl015wp	122
4.2.7	Ycr091wp konnte in Peroxisomen und Mitochondrien nachgewiesen werden	123
4.2.8	Yor228cp ist ein mitochondriales Protein	124
4.2.9	Ylr095wp/Sfc1p ist ein mitochondriales Protein	124
4.2.10	Yhr199cp ist ein mitochondriales Protein	125
4.2.11	Ist Yal054cp peroxisomal?	126
4.2.12	Für 22 Proteine konnte keine peroxisomale Lokalisation festgestellt werden	128
4.2.12.1	Proteine der Lipid-Partikel	128
4.2.12.2	Cytosolische Proteine	128
4.2.12.3	Proteine mit ungeklärter Lokalisation	130
4.2.13	Pmp15p, Pmp17p und Pmp18p	133
4.2.14	Ausblick	133
4.3	Funktionsanalysen zu Pex11p	134
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>152</b>

## Abkürzungen

Ac	Acetat
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
CoSMoS	“Context Sensitive Motif Searches“
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DsRed	<i>Discosoma species</i> Rot (Rotes Fluoreszenz-Protein)
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärktes (“enhanced“) Chemilumineszenzsystem
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	“Electrospray Ionisation“
EUROSCARF	“European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analysis“
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grünes Fluoreszenz-Protein
<i>H. polymorpha</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i>
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactosid
LB	Luria-Bertani (Medium)
LC	Flüssigkeitschromatographie
LiAc	Lithiumacetat
MALDI	“Matrix-assisted Laserdesorption/Ionisation“
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Min.	Minute
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NADPH	Nicotinaminadeninindinukleotidphosphat
OAF1	“Oleate activated transcription factor“ 1
O.D. <sub>nm</sub>	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge (nm)
ORE	“Oleate response element“

---

ORF	Offener Leserahmen
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBDs	“peroxisomal Biogenesis disorders“
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>pex</i>	“Peroxisome assembly“
PIP	“Peroxisome induction pathway“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTS	Peroxisomales “targeting“ Signal
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAGE	“Serial Analysis of Gene Expression“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	“Synthetic dropout“ (Minimal-Medium)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	Src Homologie 3
TAP	“Tandem affinity purification“
TCA	Trichloressigsäure
TPP	Thiamin-Pyrophosphat
TPR	“Tetratricopeptid repeats“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween®40	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
U	Unit (Enzymeinheit)
üN	über Nacht
v	Volumen
w	Gewicht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ralf Erdmann danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die Forschungsmöglichkeiten in seiner Arbeitsgruppe und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau PD Dr. Shiao Li Oei danke ich für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Helmut E. Meyer und Frau Heike Schäfer danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und für den fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch, den ich mit ihnen führen konnte. Herrn Dorian Immler und Herrn Albert Sickmann danke ich für die Einführung in die theoretischen Grundlagen der Massenspektrometrie und die ersten Analysen.

Frau Dr. Sigrun Reumann danke ich für die Hilfestellungen bei den elektrophysiologischen Messungen und Herrn Prof. Dr. Roland Benz für die großzügige Bereitstellung der Apparaturen in seiner Arbeitsgruppe, für vielfältige Anregungen und die kurzweilige Stadtführung durch das historische Würzburg.

Mein besonderer Dank gilt Hanspeter Rottensteiner für seine Hilfsbereitschaft, Geduld, wichtige Anregungen und für die Durchführung der Northern-Blot-Analysen in Wien.

Meinen lieben Arbeitskollegen Hanspeter Rottensteiner, Katharina Stein, Xinji Hong und Kerstin Schulz möchte ich für die gemeinsame Zeit, die wir im Labor, aber auch im Privaten verbracht haben, herzlich danken.

Frau Wendel möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Ratschläge danken, mit denen sie mir fast immer helfen konnte.

Für das Korrekturlesen und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich bei Ines Heiland, Jörg Eckert, Claudia Holroyd und Kerstin Schulz.

Frau Riedel und Frau Werth danke ich, dass sie so umfassend für uns gewirkt haben.

Danke auch an alle jetzigen und ehemalige Mitglieder der Arbeitsgruppen Erdmann und Kunau.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern für ihre allumfassende Unterstützung und für die vielen Carepakete, mit denen sie mich in Berlin versorgt haben.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Katja Nau
Geburtsdatum	12.10.1972
Geburtsort	Morbach/Hunsrück
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1979-1983	Grundschule Schillingen
1983-1992	Staatliches Gymnasium Hermeskeil
1992	Abschluss: Abitur

## Hochschulstudium

1992-1998	Studium der Biologie, Universität Kaiserslautern
1995-1996	Wissenschaftliche Hilfskraft im Fachbereich Biologie
1997-1998	Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Abteilung Pflanzenphysiologie, Universität Kaiserslautern, unter Leitung von Prof. Dr. H. Kauss Titel: Identifizierung von Phosphoproteinen bei der Aktivierung von <i>PR-1</i> Genen in Tabak mit zweidimensionaler Gelelektrophorese
1998	Abschluss: Diplom-Biologin

## Promotion

1998-2002	Promotionsstudium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum und Freie Universität Berlin Anfertigung der Doktorarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. R. Erdmann
2002	Promotion im Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie der Freien Universität Berlin

## Hochschullehre

SS 98	Betreuung des Biochemischen Praktikums für Mediziner, Ruhr-Universität Bochum
WS 98/99 - WS 01/02	Planung und Durchführung des Grundpraktikums "Lipide und Membranen" für Biochemiker, Freie Universität Berlin
SS 99 - WS 01/02	Planung und Durchführung des Fortgeschrittenenpraktikums "Zellbiochemie", Freie Universität Berlin