

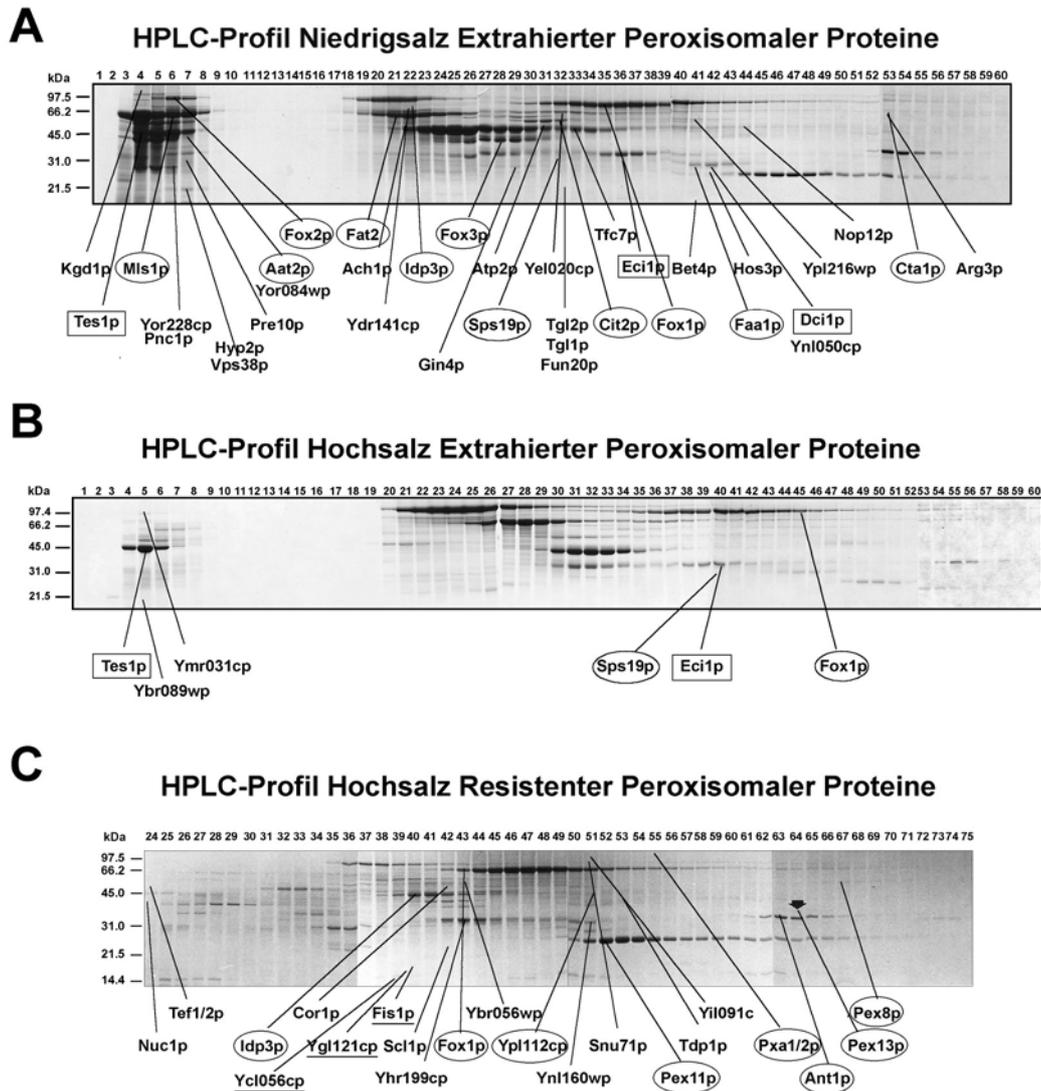
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifizierung potentieller peroxisomaler Proteine

Die Identifizierung peroxisomaler Proteine und ihre Charakterisierung ist für das Verständnis der Funktion und Biogenese dieses Organells notwendig. Da bisher lediglich 24 Peroxine und einige Proteine der  $\beta$ -Oxidation identifiziert wurden, ist die Suche nach weiteren peroxisomalen Proteinen ein wichtiges Ziel der derzeitigen Forschung.

Im Rahmen eines reversen genetischen Ansatzes zur Identifizierung peroxisomaler Proteine aus *S. cerevisiae* (59) konnten bisher mehr als 30 Proteine identifiziert und z. T. charakterisiert werden (R. Erdmann, persönliche Mitteilung). Darunter befindet sich u.a. Pex13p, ein integrales Membranprotein und wichtige Komponente der peroxisomalen Translokationsmaschinerie, dessen Beteiligung am Importprozess von verschiedenen Arbeitsgruppen mittlerweile nachgewiesen werden konnte (55, 60, 86). Das für die Proliferation von Peroxisomen verantwortliche Pex11p wurde ebenfalls mittels dieses Ansatzes identifiziert (59), ebenso das kürzlich charakterisierte Ant1p, ein peroxisomales Protein, das zur Familie der mitochondrialen ADP/ATP-Transporter gehört (182). R. Erdmann isolierte Peroxisomen aus Ölsäure-induzierten *S. cerevisiae* Zellen und extrahierte peroxisomale Proteine sukzessiv mit Niedrig- und Hochsalz-Puffer (59). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine der individuellen RP-HPLC-Fractionen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Molekulargewicht getrennt, mit Coomassie-Blau angefärbt und einzelne Proteinbanden ausgeschnitten. Abb. 3.1 A-C zeigt die RP-HPLC-Profile der verschiedenen Extrakte.

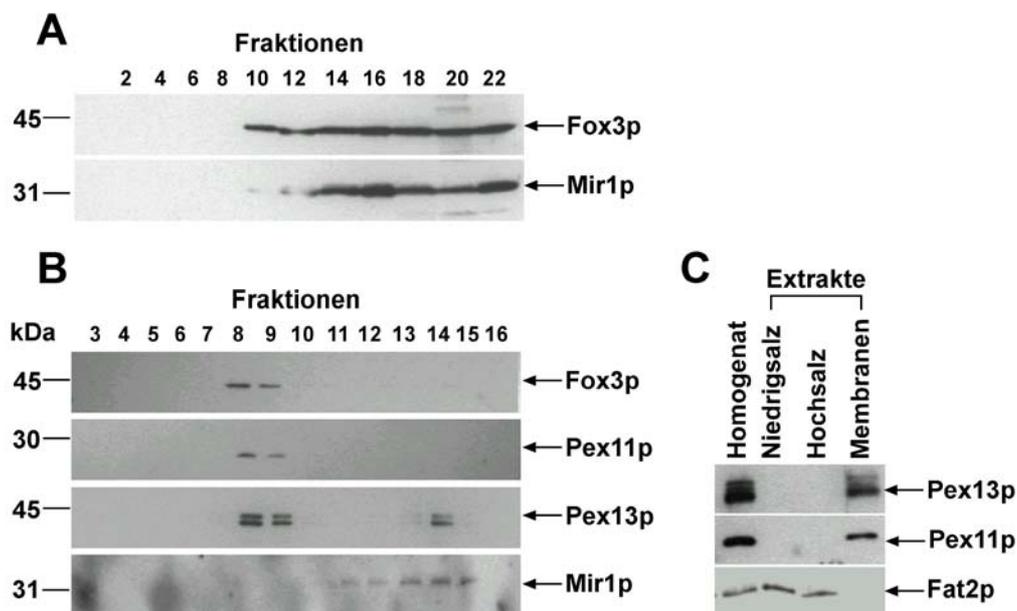
Die Identifizierung der Proteine erfolgte zunächst durch N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau), später durch Massenspektrometrie. Da das Potential dieses proteomischen Ansatzes mit der Identifizierung der nun bekannten Proteine noch nicht erschöpft war, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere 78 Proteinbanden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnten 59 verschiedene Proteine identifiziert werden, von denen 19 als peroxisomale Proteine bereits bekannt waren. Darunter befanden sich auch die neu identifizierten Proteine Eci1p (Enoyl-CoA Isomerase) und Dci1p (Dienoyl-CoA Isomerase), welchen eine akzessorische Funktion beim Abbau ungesättigter Fettsäuren zukommt, und die peroxisomale Thioesterase Tes1p (Abb. 3.1, durch eckige Umrandung markiert). Bei 29 Proteinen wurde von einer Untersuchung der peroxisomalen Lokalisation abgesehen, da sie bereits in anderen Organellen nachgewiesen wurden oder starke Ähnlichkeiten zu Proteinen der Mitochondrien, des Nukleus oder des Cytosols zeigten. Für elf Proteine dieses Ansatzes konnte eine potentielle peroxisomale Lokalisation angenommen werden, so dass ihre zelluläre Lokalisation in dieser Studie untersucht wurde.



**Abb. 3.1: HPLC-Profile der Reinigung und Identifizierung verschiedener Proteine.** (A) Niedrigsalz- und (B) Hochsalz-extrahierte sowie (C) Hochsalz-resistente Proteine der Extrakte wurden in SDS-Puffer solubilisiert und mittels präparativer Reversed-Phase-HPLC getrennt. Die mittels Massenspektrometrie identifizierten, bereits bekannten peroxisomalen Proteine sind durch Umrandung markiert. Mittels Sequenzierung identifizierte Proteine sind unterstrichen. Eci1p, Dci1p und Tes1p sind durch eckige Umrandung markiert. Der Molekulargewichtsstandard ist auf der linken Seite markiert.

Ein dominantes peroxisomale Matrixprotein der  $\beta$ -Oxidation (Fox1p) kam vermutlich aufgrund von Degradation in 18 unterschiedlichen Proteinbanden unseres ersten Ansatzes zur Identifizierung peroxisomaler Proteine vor. Um diese Kontaminationen zu vermeiden, wurde in einem zweiten, modifizierten Ansatz statt eines BJ1991 Wildtyp-Stammes eine entsprechende *fox1* $\Delta$  Mutante (92) eingesetzt. In den nachfolgenden Experimenten wurden Peroxisomen in subzellulären Fraktionierungen mit Hilfe von sukzessiven Saccharose- und Accudenz-Dichtegradienten-Zentrifugationen isoliert (modifiziert nach (59)). Diese Art der Zentrifugation, in Kombination mit verschiedenen Gradienten, erlaubt eine Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien. Dabei wurden nur die auf peroxisomale Proteine überprüften Fraktionen der Saccharose-Gradienten zur Trennung in Accudenz-Gradienten

verwendet. Die Analyse der beiden Dichtegradienten ist in Abb. 3.2 A und B dargestellt. Die Detektion von Thiolase (Fox3p), Pex11p, Pex13p (peroxisomale Proteine) und Mir1p (lokalisiert in Membranen von Mitochondrien) diente zur Überprüfung der Trennung der Organellen.

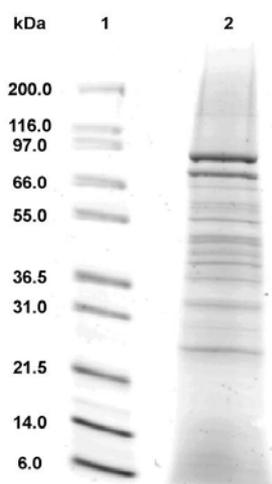


**Abb. 3.2: Detektion peroxisomaler und mitochondrialer Proteine in Fraktionen eines Saccharose- (A) und eines Accudenz-Dichtegradienten (B) der Mutante *fox1Δ* und immunologische Analyse der Fraktionen einer subperoxisomalen Fraktionierung (C).** Zellfreie Lysate von Ölsäure-induzierten Zellen wurden zunächst auf einem 32-54%-igen (w/w) Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt (A) und immunologisch auf die Verteilung des peroxisomalen Matrixproteins Fox3p und des mitochondrialen Membranproteins Mir1p analysiert. Die die peroxisomalen Proteine enthaltenden Fraktionen 8-11 wurden auf einem 20-40%-igen (w/w) Accudenz-Dichtegradienten (B) erneut aufgetrennt und ebenfalls auf die Verteilung der peroxisomalen Markerproteine Fox3p, Pex11p, Pex13p und des mitochondrialen Markers Mir1p analysiert. Zur Detektion wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose immobilisiert und diese dann mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Pex13p und Mir1p, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. (C) Anteile peroxisomaler Fraktionen wurden nach sukzessiver Trennung auf einem Saccharose- und einem Accudenz-Dichtegradienten mit Niedersalz (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) und Hochsalz (10 mM Tris/HCl, pH 8,0/500 mM KCl) extrahiert und mittels Ultrazentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Zur immunologischen Detektion der angegebenen peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen mit Hilfe von SDS-PAGE separiert und auf Nitrocellulose immobilisiert. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Pex13p, Pex11p und Fat2p inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Anschließend erfolgte eine subperoxisomale Fraktionierung derjenigen Fraktionen des Accudenz-Dichtegradienten, modifiziert nach Erdmann und Blobel (59), die peroxisomale Proteine enthielten (Fraktionen 7-9). Durch hypotonische Lyse der Organellen mit Niedersalz-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0) werden dabei Matrixproteine freigesetzt, die sich nach anschließender Zentrifugation im Überstand befinden. Die anschließende Extraktion der sedimentierten Proteine mit Hochsalz-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM KCl) führt dann zur Freisetzung der schwach mit der Membran assoziierten Proteine (59). Das nach der Zentrifugation gewonnene Sediment enthält vornehmlich integrale, aber auch periphere

Membranproteine. Die erhaltenen Proben wurden immunologisch untersucht, wobei die Detektion von Pex13p, Pex11p und Fat2p zur Überprüfung der Präparation diente.

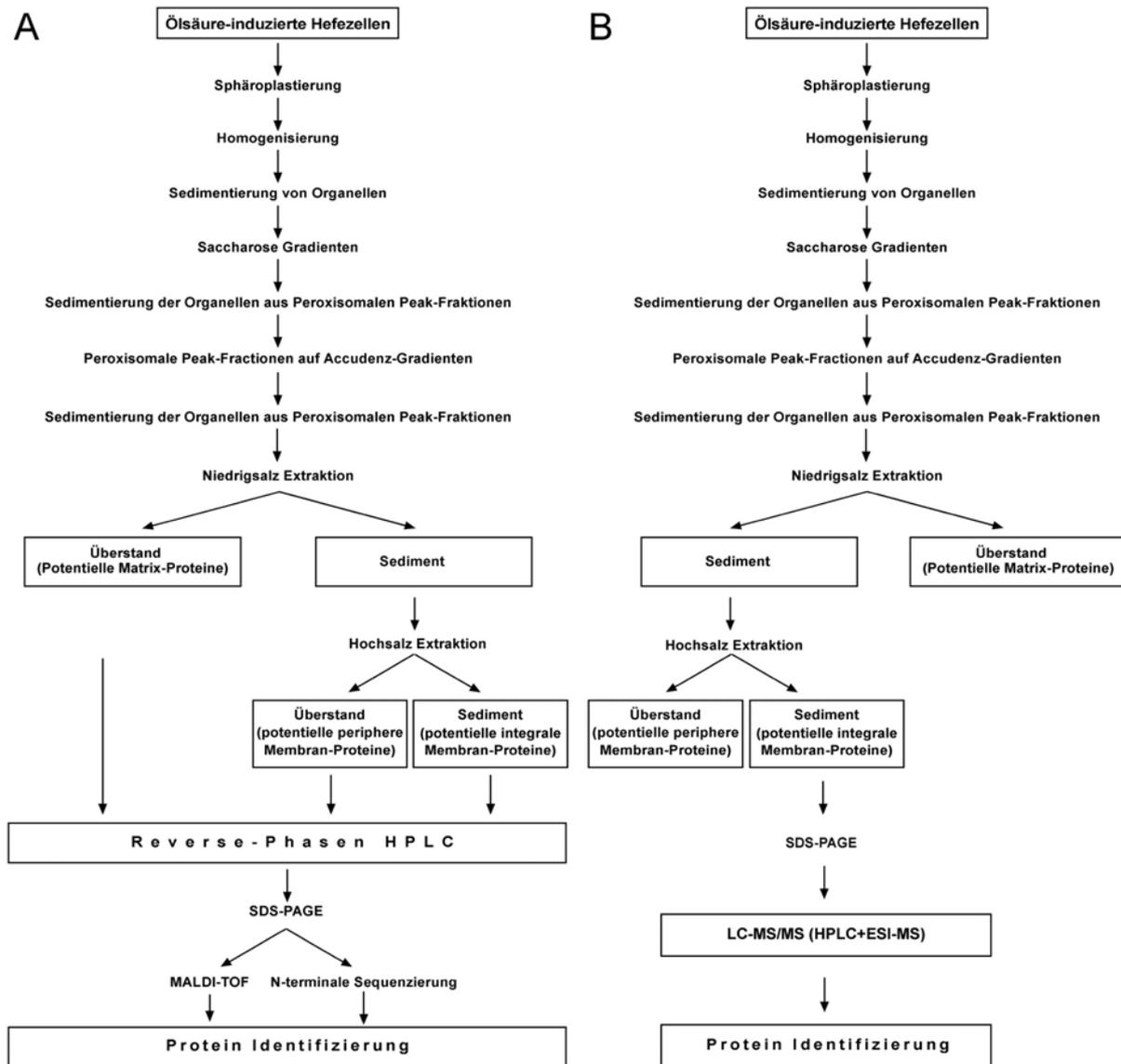
Wie in Abb. 3.2 C gezeigt, konnten die integralen peroxisomalen Membranproteine Pex13p und Pex11p ausschließlich im Sediment detektiert werden. Das schwach mit der peroxisomalen Membran assoziierte Protein Fat2p (19) konnte zum Teil mit Niedrigsals-, aber auch mit Hochsals-Puffer extrahiert werden. Diese Daten belegen zwar keine ausreichende Trennung der Matrixproteine von schwach an die Membran assoziierten Proteinen, aber eine gute Trennung letzterer von integralen und stark an die peroxisomale Membran assoziierten Proteinen.



**Abb. 3.3: SDS-Gel zur Membranpräparation.** Proteine des 4-20%-igen SDS-Gels wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Größen des Molekulargewichtsmarkers sind links angegeben, (1) gibt den Verlauf des Molekulargewichtsmarkers an, (2) Spur der Proteine aus der Membranpräparation.

Die sukzessiv Niedrig- und Hochsals-Puffer resistenten Proteine (Membranproteine) wurden in einem SDS-haltigen Puffer solubilisiert und mittels 1-D SDS-PAGE aufgetrennt. Abb. 3.3 zeigt ein von Heike Schäfer (Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) angefertigtes 4-20%-iges SDS-Gel, das zur weiteren Analyse verwendet wurde. Nach der Elektrophorese wurde die gesamte Proteinspur (Abb. 3.3, Spur 2) in kleine Streifen geschnitten und anschließend massenspektrometrisch (MALDI-MS und LC-ESI-MS) analysiert, ohne dass eine weitere Trennung mittels Reversed-Phase HPLC erfolgte (205). Mit dieser modifizierten Methode zur Identifizierung peroxisomaler Membranproteine konnten aus einem Proteingemisch 66 Proteine nachgewiesen werden. Von 41 Proteinen war eine Lokalisation in der Zelle bereits bekannt, darunter befanden sich die meisten peroxisomalen Membranproteine. Für 22 Proteine war eine peroxisomale Lokalisation noch nicht bewiesen oder generell unbekannt (Tab. 3.2). 17 unbekannte Proteine dieses Ansatzes und zwei inzwischen als peroxisomal identifizierte Proteine (79), die somit als Kontrollen betrachtet wurden, wurden einer Funktionsanalyse unterzogen.

Zum Vergleich sind die beiden Methoden schematisch in Abb. 3.4. gegenübergestellt.



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung der beiden in dieser Arbeit eingesetzten reversen genetischen Ansätze.** (A) Ansatz nach Erdmann und Blobel (59), (B) modifizierter Ansatz.

Zusätzlich zu den massenspektrometrisch neu identifizierten Proteinen wurden drei Proteine, die zuvor mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert worden waren (R. Erdmann, persönliche Mitteilung), analysiert. Diese sind in Abb. 3.1 durch Unterstreichung markiert.

## 3.2 Charakterisierung identifizierter Proteine

### 3.2.1 Die peroxisomalen Proteine Eci1p, Dci1p und Tes1p

Unter Verwendung des reversen genetischen Ansatzes nach Erdmann und Blobel (59) wurden zu Beginn dieser Arbeit drei neue peroxisomale Proteine gefunden (Eci1p, Dci1p und Tes1p, Abb. 3.1, durch rechteckige Umrandung markiert). Nahezu zeitgleich identifizierten Geraghty und Mitarbeiter dieselben Proteine in der *in silico*-Analyse CoSMoS ("Context Sensitive Motif Searches"). Deren Methode weist Proteine nach, die peroxisomale Signalsequenzen vom Typ 1 oder 2 bzw. ein "oleat response element" (ORE) (51, 129, 202) in ihrer Promotorsequenz enthalten (79). Die Identifizierung derselben Proteine durch unterschiedliche Ansätze führte zur Zusammenarbeit der beiden Arbeitsgruppen. Untersuchungen zur Funktionsanalyse dieser Proteine ergaben, dass es sich dabei um eine  $\Delta^3, \Delta^2$ -Enoyl-CoA Isomerase (Eci1p) handelt, ein Enzym, das essentiell für die  $\beta$ -Oxidation von ungesättigten Fettsäuren ist, um eine Dienoyl-CoA Isomerase (Dci1p), die mit Eci1p *in vivo* assoziiert zu sein scheint und um eine Acyl-CoA Thioesterase (Tes1p), die die Hydrolyse von Acyl-CoA in freie Fettsäuren und CoA katalysiert (77, 78, 124).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden zehn identifizierte Proteine näher charakterisiert und die subzelluläre Lokalisation von 25 weiteren identifizierten Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Mutanten-Analyse bestimmt.

### 3.2.2 Charakterisierung des Yor084wp

#### 3.2.2.1 Identifizierung und Sequenzanalyse

Die Identifizierung dieses Proteins mit dem offenen Leserahmen YOR084W erfolgte zunächst im Rahmen des reversen genetischen Ansatzes zur Identifizierung potentieller peroxisomaler Matrixproteine (Niedrigsalz-Extraktion). Dasselbe Protein konnte jedoch ebenfalls in unserem zweiten Ansatz aus dem Pool Hochsalz-resistenter Proteine detektiert werden. Dass es sich dabei um ein potentielles peroxisomales Protein handelt, wurde durch die Identifizierung mittels der computergestützten Analyse "CoSMoS" (79) und mittels der seriellen Genexpressions-Analyse "SAGE" ölsäureinduzierter Proteine ("Serial Analysis of Gene Expression") (125) untermauert. Der in seiner Funktion in der Hefezelle noch unbekannt ORF YOR084W mit der Größe von 1164 Bp kodiert für ein Protein mit 387 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 43,7 kDa (Abb. 3.5).

-480	AGCTGCAAAATGGATGGACGGACAAGACACTTCCCGAGCTGGAGACGGAGCTTGCTCCAG	-421
-420	CAGTGCAGACGCGCCACGTCGCTATCAACAACAGATTCCAGATAGTGCAGACGCGGGTA	-361
-360	CTTCCGCGCATAACAGCGTTTCTTCAGGCGCTCGGAGGCCACCCACCAGGGAGGAGGCCA	-301
-300	CGGCTGTCGAAACACTGATGCTATTGTGCTCGCCTACCAAGAAGCAACACCCGACCCG	-241
-240	TGCCGGCGACATCTGCTGGAGAACCACGGACGAAACGGAGCCCGAGTCCGGATACCGAAG	-181
-180	TGGAGACGCTCTTAATGTGGTAGTACGAGTTTTTCTCCGCAATCT <u>CGGAGTTAGTGCAGC</u>	-121
-120	<u>CGCGCCCGCT</u> GCTGCACCCTTTAGCATATATATAAAGTGCCTAATGTGCGTGTAAAAAA	-61
-60	GCTCACTAGTGGCTACTCTGCTTATCTCTGCGTATCCGCCGATCAACATCCGCGGCTAAA	-1
1	<b>ATG</b> GAACAGAACAGGTTCAAGAAAGAAACGAAAACTTGTAGCGCTAGCTGGCCGCGCGCA	60
1	M E Q N R F K K E T K T C S A S W P R A	20
61	CCGCAGTCGACGCTGTGTGCGACAGATCGCCTCGAGCTCACATACGATGTGTACTAGC	120
21	P Q S T L C A T D R L E L T Y D V Y T S	40
121	GCAGAGCGGCAACGCGGCTCTCGCACTGCCACTAGGCTTAACCTTGTGTTTTGCACGGC	180
41	A E R Q R R S R T A T R L N L V F L H G	60
181	AGCGGCATGAGTAAGTGGTATGGGAGTACTATTTGCCGCGTCTGGTAGCCGCGATGCG	240
61	S G M S K V V W E Y Y L P R L V A A D A	80
241	GAGGGCAATTATGCCATCGACAAGGTTTTGTTGATCGACCAGGTTAACCACGGTGATTCT	300
81	E G N Y A I D K V L L I D Q V N H G D S	100
301	GCGGTACGCAACCGCGGACACTCGGCACCAATTTCAACTGGATCGACGGGGCCCGCGAC	360
101	A V R N R G R L G T N F N W I D G A R D	120
361	GTGCTCAAGATTGCCACATGCGAGTTGGGCGATTTGACAGCCACCCGGCACTAAACGTA	420
121	V L K I A T C E L G S I D S H P A L N V	140
421	GTCATCGGCCACTCGATGGGCGGGTCCAGGCTCTTGCGTGTGACGTCTGCAGCCCAAT	480
141	V I G H S M G G F Q A L A C D V L Q P N	160
481	CTGTTTCATTGCTCATCTTGATCGAGCCTGTAGTAATCACACGAAAGCCATCGGCGCC	540
161	L F H L L I L I E P V V I T R K A I G A	180
541	GGGAGGCCAGGGCTTCCGCCGATTCTCCGCAGATCCAGAAAATCTTTATAACTCCCTA	600
181	G R P G L P P D S P Q I P E N L Y N S L	200
601	CGTTTTAAGACGTGCGACCATTTTCGCTAACGAGTCCGAATATGAAAATATATGAGGAAC	660
201	R L K T C D H F A N E S E Y V K Y M R N	220
661	GGTTCCCTTTTTACCAATGCGCACAGCCAAATCTGCAAAACATCATCGATTTTGAGAGG	720
221	G S F F T N A H S Q I L Q N I I D F E R	240
721	ACAAAAGCCTCTGGAGACGATGAAGATGGTGGACCCGTTCCGCACGAAGATGGAGCAGGCT	780
241	T K A S G D D E D G G P V R T K M E Q A	260
781	CAAAATCTCCTCTGCTACATGAACATGCAGACTTTTGCGCCTTTCCTGATCAGCAATGTG	840
261	Q N L L C Y M N M Q T F A P F L I S N V	280
841	AAGTTTGTGAGGAAGCGGACTATCCACATTGTGGGCGCGCTCCAACTGGTGCTCCCG	900
281	K F V R K R T I H I V G A R S N W C P P	300
901	CAAAATCAGCTGTTTTTGCAGAAAACCTACAGAACTACCATCTCGATGTCATTCCCGGC	909
301	Q N Q L F L Q K T L Q N Y H L D V I P G	320
961	GGCTCCCACTTGGTCAACGTTGAGGCTCCGGACCTGGTGATCGAGAGGATTAATCACCAC	1020
321	G S H L V N V E A P D L V I E R I N H H	340
1021	ATCCACGAGTTTGTCTTACCTCCCGCTGCAGTCCACACATCCGCAATTGACCCCTT	1080
341	I H E F V L T S P L Q S S H I P Q L T L	360
1081	GAAGAAAGAGCGGTGATGTTGACCGGGCTTTCGACTCGTTCAAGAATGAAGCTTTGGTT	1140
361	E E R A V M F D R A F D S F K N E A L V	380
1141	AAAACGACTAAACAAAAACTGTAA	1164
381	K T T K <u>Q K L</u> ***	387

**Abb. 3.5: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YOR084W-Gens.** Ein mögliches ORE ist in der Sequenz doppelt unterstrichen markiert. \*\*\* markiert das Stop-Codon, das Start-Codon ist fett markiert, eine potentielle PTS1-Sequenz ist einfach unterstrichen.

Durch Untersuchungen der DNA-Sequenz wurde im nicht kodierenden 5'-Bereich des YOR084W ein Bereich gefunden, der der konservierten Sequenz eines ORE ("oleat acid response element"), das vor allem bei Proteinen der  $\beta$ -Oxidation gefunden wurde (51, 129, 202), entspricht. Das C-terminale Tripeptid QKL-COOH, für das eine Interaktion mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p gezeigt werden konnte (143), könnte für einen PTS1-abhängigen Import in

die Peroxisomen verantwortlich sein. Die durchgeführten Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *YOR084W*-Gens mit Sequenzen einer nr-Datenbank (113) unter Verwendung des Programms BLASTP (6) zeigten keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen. Es wurde jedoch ein Sequenzabschnitt mit Ähnlichkeit zu einem Motiv bakterieller Lipasen/Esterasen gefunden.

```

M.genitalium          -----MRLEIENGLFVNDPVVNELGK-----ICFFH 27
M.pneumoniae         MHSRSKFGIILKFNHFLWP---GMRLEIENGLFVCDPFLNERGK-----IFFLH 47
S.c.YOR084W          -MEQNRFKKTKTCSASWPRAPQSTLCATDRLELTYDVVYTSAEQRRRSRATRLNLVFLH 59
                      * : **:. * . :
                      : : * :

M.genitalium          PFTGNLTNKLSEFRSHFNRYSFYA-----INYPGHGNSVINNPQLEFSY-WLEITK 77
M.pneumoniae         AFTGNITNKLSE-THFKDYSFYG-----INFPGHGNSVIHNSQSELDNF-WIKLVQ 96
S.c.YOR084W          GSGMSKVWWEYLLPRLVAADAEGNYAIDKVVLLIDQVNHGDSAVRNRRLGTNFWIDGAR 119
                      . . : :. . . * : .**:*:. * . * : : * : . :

M.genitalium          QFFDKHNLKD-----VILFGHSIGGGLAVALTNYLSSDQYKAVLLEAP----- 120
M.pneumoniae         QFFNKYQLKN-----VVLFGHSIGGGLAIALTQVLTKEQIKGIILEAP----- 139
S.c.YOR084W          DVLKIATCELGSIDSHPALNVVIGHSMSGG-FQALACDVLQPNLFHLLILIEPVVITKAI 178
                      :. . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : * *

M.genitalium          -----LNPVAVETPLNIVQNLIPDPDSDFAVIQKCLVYN-----IEKKGANFKEY 166
M.pneumoniae         -----LNPVAVETPLNIVQNLIPDPDSDFAVIQKCLVYN-----IEKKGANFKEY 166
S.c.YOR084W          GAGRPGLPDPSPIPENLYNSLRKTKCDHFANESEYVKYMRNGSFFTNAHSQILQNIIDF 238
                      * * * . * . . * . . . * . . . * . . . * . . . * : :

M.genitalium          CERERQKSIHQNRQLKVMLEPST-----LKQNIIVLINAFLKLNCPALWIHGKQDGI 219
M.pneumoniae         CAKQKQKMIQKYAPLKVMLQPEQ-----AEQRLQLIDAAFKRLSYPTLWIHGQEDGIV 237
S.c.YOR084W          ERTKASGDDEDGGPVRTKMEQAQNLCCYMMNQTFAPFLISNVKFKVRRKRTIHIIVGARSNWC 298
                      : . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : * * . . .

M.genitalium          KYLPSKAYYESLNNKQIQFKA----- 240
M.pneumoniae         RYLPSKAYLESLHNPLIELVGLSNTAHTTFEQQPQFLQLVEQFLNKLNKIE--AAHTP 295
S.c.YOR084W          PPQNQLFLQKTLQNYHLDVIPGG--SHLVNVEAPDLVIERINHIIHEFVLTSPLQSSHIP 356
                      . : : * * : :

M.genitalium          ----- 315
M.pneumoniae         YFEQPQKFLSLVNDFFQLIS----- 315
S.c.YOR084W          QLTLEERAVMFDRAFDSFKNEALVKTTKQKL 387

```

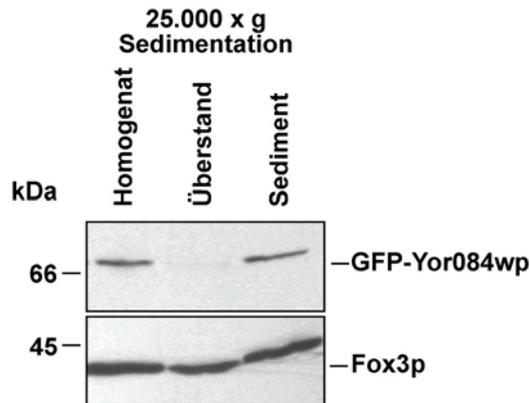
**Abb. 3.6: Vergleich der Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YOR084W mit Proteinen der prokaryotischen Lipase-Estase-Familie.** Der Sequenzvergleich des ScYOR084W mit einer Lipase/Esterase, (*Mycoplasma genitalium*, AAC71532) und einer Triacylglycerid Lipase 3 (*Mycoplasma pneumoniae*, AAB96044) erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms ClustalW (103). Homologien sind nach dem Blossum62-Algorithmus (97) angezeigt. Identische Aminosäuren (\*), stark (:) und schwach konservierte (.) sind markiert. Das identifizierte GX SXG-Motiv ist in den drei Sequenzen grau unterlegt.

Eine Profilanalyse der Sequenz des *YOR084W* führte zur Identifizierung der Aminosäurefolge GHSMG, die der Konsensussequenz GX SXG entspricht (Abb. 3.6, grau unterlegt), wie sie in den meisten Lipasen und Esterasen zu finden ist (48). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zweier Lipasen aus *Mycoplasma genitalium* und *Mycoplasma pneumoniae* mit *S.c.YOR084W* unter Verwendung des Programms ClustalW (103) ist in Abb. 3.6 dargestellt.

### 3.2.2.2 Subzelluläre Lokalisation

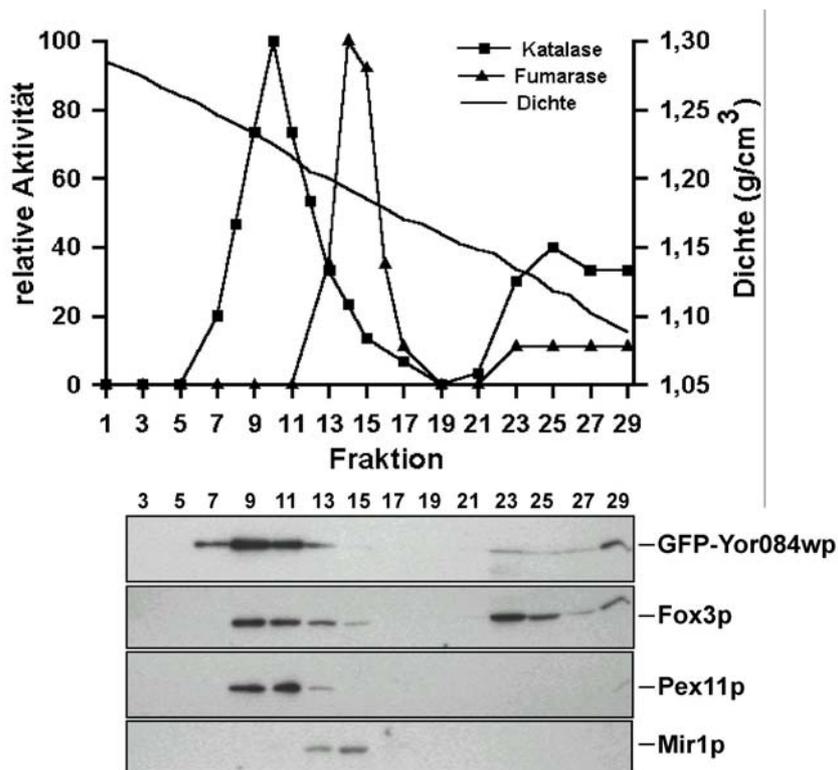
Die zelluläre Lokalisation des Yor084wp wurde durch differentielle Zentrifugation, subzelluläre Fraktionierung und Doppel-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde zunächst ein Fusionskonstrukt aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem offenen Leserahmen YOR084W erstellt und in den Wildtyp-Stamm BJ1991 transformiert.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation des GFP-Yor084wp wurde ein zellfreies Lysat der Ölsäure-induzierten Transformante mittels differentieller Zentrifugation bei 25.000 x g in eine lösliche (Überstand) und eine partikuläre (Sediment) Fraktion getrennt und auf die Verteilung von GFP-Yor084wp untersucht. Die Detektion des GFP-Yor084wp erfolgte hauptsächlich in der partikulären, die Organellen enthaltende Fraktion und deutete auf eine Organellenassoziation des Proteins hin (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Immunologische Detektion des GFP-Yor084wp in einem 25.000 x g Organellen-Sediment.** Ein zellfreies Homogenat der BJ1991-Transformante wurde durch differentielle Zentrifugation bei 25.000 x g in einen löslichen Überstand und in eine partikuläre Fraktion getrennt. Gleiche Volumenanteile jeder Fraktion wurden mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Der Nitrozellulose-Filter wurde mit Antikörpern gegen GFP inkubiert und Immunkomplexe wurden unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Zur weiteren Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurde ein zellfreies Organellensediment der Transformante auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Diese Art der Zentrifugation erlaubt die Trennung einzelner Organellen (insbesondere Peroxisomen und Mitochondrien) voneinander, sowie dieser von den verbleibenden löslichen Bestandteilen, die in den oberen Fraktionen zu finden sind. Die biochemische Analyse dieses Dichtegradienten ist in Abb. 3.8 dargestellt.

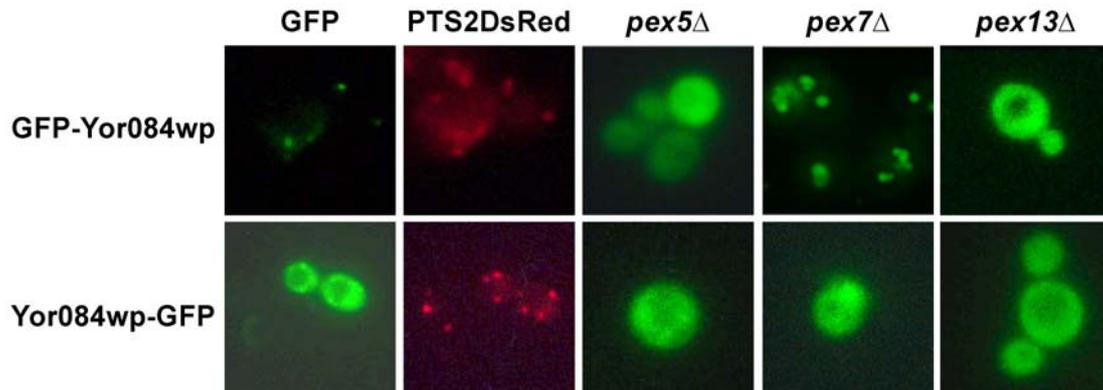


**Abb. 3.8: Detektion des GFP-Yor084wp in den peroxisomalen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, des mitochondrialen Mir1p und des GFP-Yor084wp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP-Yor084wp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosefilter wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Entsprechend einer peroxisomalen Lokalisation konnte der Hauptanteil des GFP-Yor084wp-Fusionsproteins in Gradientenfraktionen mit einer für Peroxisomen typischen Dichte von  $1.225 \text{ g/cm}^3$  nachgewiesen werden, deutlich getrennt von Mitochondrien, die bei einer Dichte von  $1.192 \text{ g/cm}^3$  vorlagen. Zudem lag eine Kolo­kalisierung des Proteins mit dem peroxisomalen Enzym Katalase, dem peroxisomalen Matrixprotein Fox3p und dem peroxisomalen Membranprotein Pex11p vor. Geringe Mengen an GFP-Yor084wp und Katalase und ca. 50% des Fox3p befanden sich auch in Fraktionen des Überstandes (Fraktionen 23-29). Sedimentationsanalyse und Dichtegradienten-Zentrifugation belegten somit biochemisch die peroxisomale Lokalisation des bisher hypothetischen Proteins Yor084wp.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Lokalisation wurde der offene Leserahmen des YOR084W entweder an seinem amino- oder carboxy-terminalen Ende mit GFP gekoppelt und in einen BJ1991-Stamm transformiert, in dessen Genom zuvor das rot-fluoreszierende, peroxisomal lokalisierte Fusionsprodukt PTS2DsRed (*Discosoma species* rot; (219))

integriert worden war. Nach Wachstum der Transformanten auf entsprechendem Selektivmedium wurden jeweils drei Klone auf ölsäurehaltiges Medium überführt, für mindestens 24 Std. inkubiert und für die anschließende Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.



**Abb. 3.9:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yor084wp, Yor084wp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 und der Mutanten *pex5*Δ, *pex7*Δ und *pex13*Δ mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

Die Fusionsprodukte GFP-Yor084wp und PTS2DsRed zeigten in den Zellen des Wildtyp-Stammes ein identisches punktiertes Fluoreszenz-Verteilungsmuster (Abb. 3.9). Da die Lokalisation des PTS2DsRed in der peroxisomalen Matrix belegt ist (219), kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei den markierten Organellen tatsächlich um Peroxisomen handelt. Im Gegensatz zur N-terminalen Fusion des GFP an Yor084wp konnte bei der C-terminalen Kopplung (Yor084wp-GFP) nur eine diffuse Fluoreszenz des Cytosols der Zellen des Wildtyps beobachtet werden, wohingegen das als peroxisomaler Marker dienende PTS2DsRed punktiert vorlag. Eine Blockierung des carboxy-terminalen Endes des offenen Leserahmens des YOR084W (QKL-<sub>COOH</sub>) verursachte somit diese Mislokalisierung des GFP-Fusionsproduktes ins Cytosol, was auf einen Einfluss der C-terminalen Sequenz für die korrekte Zielsteuerung zu den Peroxisomen hinweist. In Konsensus zu Lametschwandtner *et al.* (143), die in einem Two-Hybrid-Screening-Verfahren für ein QKL-<sub>COOH</sub> in Hefe eine Interaktion mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p zeigen konnten, demonstrierte dieses Ergebnis, dass der Import in die Peroxisomen von der C-terminalen QKL-Sequenz abhängig ist.

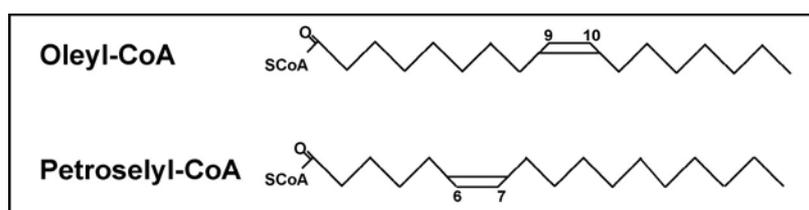
Zur genauen Klärung, ob Yor084wp tatsächlich PTS1-abhängig in die peroxisomale Matrix importiert wird, wurden die GFP-Fusionskonstrukte in die Mutanten *pex5*Δ, *pex7*Δ und *pex13*Δ transformiert. Die Mutante *pex5*Δ ist charakterisiert durch die Mislokalisierung PTS1-haltiger Proteine (239), *pex7*Δ durch die Mislokalisierung von PTS2-haltigen Proteinen (155) und die Mutante *pex13*Δ ist nicht mehr in der Lage PTS1- und PTS2-haltige Proteine in die peroxisomale Matrix zu importieren (55, 60, 86). In der *pex5*Δ Mutante resultierte die GFP-Yor084wp-Fusion in einer diffusen Verteilung der Fluoreszenz, die auf einer cytosolischen

Lokalisation des GFP-Yor084wp beruht. Das gleiche Erscheinungsbild konnte für die Mutante *pex13Δ* beobachtet werden, wohingegen ein punktiertes Verteilungsmuster in der Mutante, in der *PEX7* deletiert ist, zu erkennen war (Abb. 3.9). Die carboxy-terminale Fusion Yor084wp-GFP, die schon in Wildtyp-Zellen zu einer cytosolischen Mislokalisierung des Fusionskonstruktes führte, resultierte in den Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ* und *pex13Δ* ebenso in diffuser Fluoreszenz im Cytosol der Zellen, was die Vermutung unterstützt, dass es sich hierbei um einen PTS1-abhängigen Import in die peroxisomale Matrix handelt (Abb. 3.9).

Diese fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten für das hypothetische Protein Yor084wp einen PTS1-abhängigen und PTS2-unabhängigen Import in die Matrix der Peroxisomen belegen.

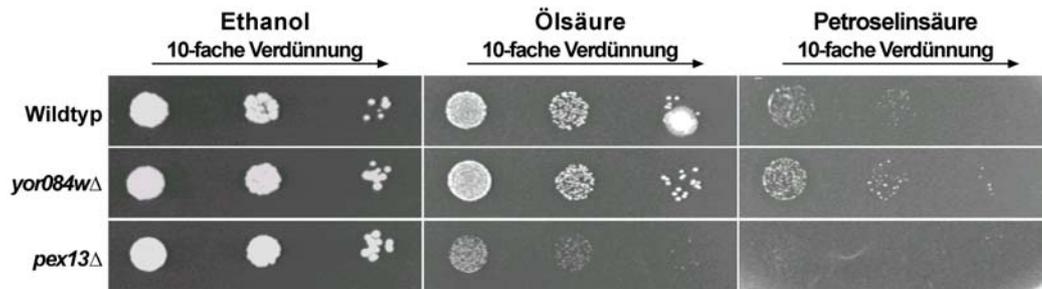
### 3.2.2.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zur Analyse einer möglichen Bedeutung des Yor084wp für die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *yor084wΔ* in der Lage ist, diese zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der *yor084wΔ* Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4742 sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante untersucht. Letztere diente in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle, da die Mutante einen generellen Wachstumsdefekt auf fettsäurehaltigen, nicht aber auf ethanolhaltigen Medien zeigt (55, 60, 86). Als alleinige Kohlenstoffquellen dienten Ethanol und die ungesättigten Fettsäuren Öl- bzw. Petroselinensäure (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung der aktivierten Fettsäuren Ölsäure und Petroselinensäure.** Die Zahlen geben die Lage der Doppelbindungen an.

Die Untersuchung erfolgte durch Wachstumsanalysen auf Agarplatten mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle (Abb. 3.11). Zur Kontrolle des gleichmäßigen Auftrages der Zellen diente ein Minimalmedium (SD, 2% Glukose, Daten nicht gezeigt). Auf allen Agarplatten konnte ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum der Mutante *yor084wΔ* beobachtet werden. Die als Kontrolle dienende *pex13Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß ein normales Wachstum auf Ethanol und ein stark vermindertes Wachstum auf Fettsäuren (Abb. 3.11). *YOR084W* spielt bei der Degradation ungesättigter Fettsäuren und beim Import peroxisomaler Matrixproteine somit scheinbar keine Rolle.

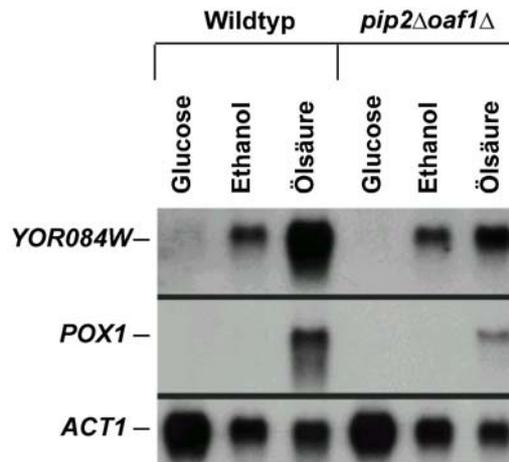


**Abb. 3.11: Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *yor084wΔ* und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle dienten Ethanol, Ölsäure bzw. Petroselinsäure. Zur Analyse des Wachstums auf Festagarplatten wurden 2  $\mu$ l einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

### 3.2.2.4 Die Expression von *YOR084W* ist durch Ölsäure induzierbar

Peroxisomale Enzyme, die direkt oder indirekt an der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind, können durch Ölsäure induziert werden. Parallel dazu kommt es in Zellen von *S. cerevisiae* zur Proliferation von Peroxisomen (140, 245). Die durch Fettsäuren induzierte Expression eines Proteins ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass dieses Protein eine bestimmte Rolle im peroxisomalen Stoffwechsel spielt. Diese positive Regulation der Expression erfolgt hierbei über einen Transkriptionsfaktor, der sich aus den beiden Proteinen Pip2p und Oaf1p zusammensetzt und der an eine definierte DNA-Sequenz ("oleat acid response element", ORE) im nicht kodierenden 5'-Bereich des jeweiligen Proteins bindet (51, 129, 202). In der Promotor-Region des *YOR084W* konnte ein solches ORE-Element identifiziert werden (Abb. 3.5).

Um die Induzierbarkeit von *YOR084W* durch Ölsäure zu testen, wurden die Zellen eines Wildtyps (BJ1991) und einer *pip2Δoaf1Δ* Mutante in Glukose-, Ethanol- oder Ölsäure-Medium angezogen, die RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels Northern-Blot-Analyse analysiert. Wie erwartet führte das Wachstum der Wildtypzellen in Ölsäure zu einer erhöhten RNA-Menge des *POX1*, das für das  $\beta$ -Oxidationsenzym Acyl-CoA-Oxidase codiert, nicht aber der Mutante. *YOR084W* zeigte ein ähnliches Expressionsprofil, was somit demonstriert, dass das Gen durch Ölsäure induzierbar ist. Unter diesen Expressionsbedingungen war die RNA des *YOR084W* im Vergleich zum *POX1* erhöht. Actin (*ACT1*) diente in diesem Experiment als Ladekontrolle (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Detektion des YOR084W in Ölsäure-induzierten Wildtypzellen des BJ1991-Stammes.** Zellen eines BJ1991-WT-Stammes und einer *pip2Δoaf1Δ* Doppel-Mutante wurden in Glukose-, Ethanol- und Ölsäure-Medium angezogen und die isolierte mRNA mittels Northern-Blot-Analyse detektiert. Es wurden 50 µg RNA/Spur aufgetragen. Zur Hybridisierung wurden Sonden gegen YOR084W, POX1 und ACT1 verwendet. Als Vergleich diente die erhöhte Expression des POX1; ACT1 diente als Ladekontrolle. Das Experiment wurde von H. Rottensteiner am Biozentrum in Wien (Österreich) durchgeführt.

### 3.2.3 Charakterisierung des YEL020C

#### 3.2.3.1 Identifizierung und Sequenzanalyse des YEL020C

Ein weiteres, in *S. cerevisiae* bisher noch nicht lokalisiertes Protein, ist das Yel020cp. Der offene Leserahmen YEL020C mit der Größe von 1683 Bp kodiert für ein Protein mit 560 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 61,3 kDa (Abb. 3.13).

```

1      ATGACCACGACCGCTACCCAACTTCGCTCAACTTTTACAAAAATATGGCATCGACACA      60
1      M T T T A T Q H F A Q L L Q K Y G I D T      20
61     GTCTTTGGAATTGTGGGCATCCCTATTGTCCAAC TAGCGGATACGATGGTTGCCAACGGT      120
21     V F G I V G I P I V Q L A D T M V A N G      40
121    ATCAAATTCATTCCATGCAGGAACGAACAGGTCCTCATATGCAGCCTCTGCTTATGGT      180
41     I K F I P C R N E Q A A S Y A A S A Y G      60
181    TATATTAGTGATAAGCCCGCGTGTACTTATTGTCGGGGCCCCGGTTTAATCCACGCA      240
61     Y I S D K P G V L L I V G G P G L I H A      80
241    CTGGCTGGTATATACAACCTCAATGAGTAATAGGTGGCCTCTTCTAGTAATTGCAGGGAGT      300
81     L A G I Y N S M S N R W P L L V I A G S      100
301    TCTTCTCAAAGTGATATACATAAAGCGGGTTTCAAGAGTTGGATCAAGTTAGTCTTTTG      360
101    S S Q S D I H K G G F Q E L D Q V S L L      120
361    TCCCCATTTTGAAGTTTACCGGAAAGTTAACCCCTGACAATATGACATGATTACTCAG      420
121    S P F L K F T G K L T P D N I D M I T Q      140
421    AAGGCTTTGAATTACTGTATACAAGGCACTGCAGGGGTTTCTTACATAGACGTCCCTGCA      480
141    K A L N Y C I Q G T A G V S Y I D V P A      160
481    GATTTTATGAGTATGAAAAACCCTTAGAAGGAAACGACCGTACAGGAAATGAATTACCG      540
161    D F I E Y E K P L E G N D R T G N E L P      180
541    ATGATATTAAC TCCAAACATATGTGGCCCTGATCCGTCGAAGATCAAAAAAGTCGTACAG      600
181    M I L T P N I C G P D P S K I K K V V Q      200
601    CTTATTTTGCAACATAAAAAATAAAAATATTCTGATTGTTATTGGAAAGGGTCCGGTAAAA      660
201    L I L Q H K N K N I L I V I G K G A V K      220
661    AACACACGAAATCCGCAGACTAGTAAATACGTTCAATCTACCATTTTACCCACCCCA      720
221    N S H E I R R L V N T F N L P F L P T P      240
721    ATGGCTAAGGGAATTGTCCAGACTCTTCTCCACTGAACGTTTCATCTGCAAGATCTCAA      780

```

241	M A K G I V P D S S P L N V S S A R S Q	260
781	GCATTGAAAATAGCGGATATTGTTCTTGTTCGCGGGCAAGATTAAGCTGGATATTGCAT	840
261	A L K I A D I V L V L G A R L N W I L H	280
841	TTTGGTACTTCACCCAATGGAAGCTCAGAAATCCATATTCATCCAGTTCGATTCCAATCCC	900
281	F G T S P K W N S E S I F I Q F D S N P	300
901	GAAACCTTGGGGGATAACAATGTCTCACCTGGTGTGACCTTTCATATGGGGAGATATA	909
301	E T L G D N N V S P G A D L S I W G D I	320
961	GGCTTGAGCGTAACCGCTTTAGTTGAGGAATTGACTCGCCAAGATTCTCGTGGGAAGTAT	1020
321	G L S V T A L V E E L T R Q D S C W K Y	340
1021	AGTGGTGTAAAGCAAGAAATACGAGAGAAAATCAACTGAATCAAACCTCGTCTATTGAGG	1080
341	S G V K Q E I R E K I Q L N Q T R L L R	360
1081	AAAGAGAAGACTAGAGGGGCACAATTGAATTACAACCAAGGTTTATGGAAACATTGAGGCCT	1140
361	K E K T R G A Q L N Y N Q V Y G T L R P	380
1141	CTTATCGATGATTACAGGACAATACTTGTGACGGAGGAGCAAATACTATGGATATTGGC	1164
381	L I D D Y R T I L V T E G A N T M D I A	400
1201	CGTATTTTCATCCCTACAGACGCTCCAAGGCGCCGTTTAGACGCGGGACCAACGCGACT	1260
401	R I S F P T D A P R R R L D A G T N A T	420
1261	ATGGGGATTGGGCTCGGATATGCTCTTGCATGCAAGGCATCTCATCCGGAACCTCGATGTG	1320
421	M G I G L G Y A <u>L A C K A S H P E L D V</u>	440
1321	GTGCTGATTCAGGGTGATTCCGCATTTGGATTCTCTGCCATGAAATTGAAACGGCAGTA	1380
441	<u>V L I Q G D S A</u> F G F S A M E I E T A V	460
1381	AGGTGTCAGCTGGCATTGGTCATCGTTGTGATGAACAATAGCGGTATTTACCATGGAGAA	1440
461	R C Q L A L V I V V M N N S G I Y H G E	480
1441	AAGGATATAGAGGGTGATTTACCTCCAACGGCACTAAGCAAGAACTGCCGTTACGATCTC	1500
481	K D I E G D L P P T A L S K N C R Y D L	500
1501	GTAGGCAAAGGACTGGGTGCCAATGATTTTTTGTCAACAATAAGCGAACTGAGCAGA	1560
501	V G K G L G A N D F F V N T I S E L S R	520
1561	TGCTTCCAACAAGCCGTGCAGCTTCTCGGACTAAAAGAGAAACAAGTGTCATCAACGTT	1620
521	C F Q Q A V Q L S R T K R E T S V I N V	540
1621	ATCATTGAGCCTGGCGAACAAAAGCAAATTGCCTTTCCTGGCAGAATAAACCGCGTTTA	1680
541	I I E P G E Q K Q I A F A W Q N K <u>P R L</u>	560
1681	TAG	1683
	***	

**Abb. 3.13: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YEL020C-Gens. \*\*\*** kennzeichnet das Stop-Codon, das Start-Codon ist fett markiert, eine potentielle PTS1-Sequenz durch einfache Unterstreichung, ein Thiaminpyrophosphat-Motiv durch doppelte Unterstreichung hervorgehoben.

Durchgeführte Sequenzvergleiche der Aminosäuresequenz des YEL020C mit Sequenzen einer nr-Datenbank unter Verwendung des Programms BLASTP (6) zeigten über den gesamten Sequenzbereich signifikante Ähnlichkeiten zu einer Oxalyl-CoA-Decarboxylase (Genbank Nr. A55219) aus *Oxalobacter formigenes* (31% Identität) und zu einer Pyruvat-Decarboxylase (Pdc1p) aus *Saccharomyces cerevisiae* (23% Identität) (106). Weitere Sequenzanalysen mit YEL020C zeigten, dass das ScYel020cp über ein potentielles PTS1 (PRL-COOH) verfügt (143). Außerdem wurde eine deutliche Homologie (40% Identität) zu einer humanen 2-Hydroxyphytanoyl-CoA Lyase 2-HPCL (AJ131753), einem peroxisomalen Thiaminpyrophosphat-abhängigen Enzym (69) gefunden.

Hs2-HPCL	MPDSNFAERSEEQVSGAKVIAQALKTQDVEYIFGIVG-IPVTEIAIAAQQLGKIYIGMRN	59
ScYEL020C	-----MTTATQHFQQLLQKYGIDTVFGIVG-IPVQLADTMVANGIKFIPCRN	48
OFOCD	-----MSNDNVELTDGFHVLIDALKMNDIDTMYGVVG-IPITNLARMWQDDGQRFYSFRH	55
ScPDC1	-----MSEITLGKYLFERLQVNVNVTVFGLPDFNLSLLDKIYEVEGMRWAGNAN	50
	: : : * : . : : * : * : : : * : :	
Hs2-HPCL	EQAACYAASAIGYLTSRPGVCLVVSGLIHALGGMANANMNCWPLLVIIGS-----SE	113
ScYEL020C	EQAASYAASAYGYSIDKPGVLLIVGGPLIHALAGIYNSMSNRWPLLVIAGS-----SS	102
OFOCD	EQHAGYAASIAAGYIEGKPGVCLTVSAPGFLNGVTSLAHATTNCFPMILLSGS-----SE	109
ScPDC1	ELNAAAYAADGYARIKGMSCIIITTFVGVGELSALNGIAGSYAEHVGVLVHVVGPSISAQAK	109
	* * * * . . . . . : . . * : . : . : : : : : * : . :	
Hs2-HPCL	R--NQETMGAFQEFQVEACRLYTKFSARPPSSIEAIPFVIEKAVRSSIYGRPGACYVDIP	171
ScYEL020C	Q--SDIHKGGFQELDQVSLSPFLKFTGKLT-PDNIDMITQKALNYCIQGTAGVSYIDVP	159
OFOCD	REIVDLQQGDYEEMDQMNVARPHCKASFRINSIKDIPIGIARAVRTAVSGRPGGVYVDLP	169
ScPDC1	QLLHHTLGNQDFTVTFHRMSANISSETTAMITDIATAPAEIDRCIRTTYVTQR-PVYLGLP	168
	: . * : : : . : : : : : : : : : : * : : *	
Hs2-HPCL	ADFVN---LQVNVNSIKYMERCMSPPI SMAETSAVCTAASVI--RNAKQPLLIIGKGAA	225
ScYEL020C	ADFIEYEKPLEGNDRTGNELPMLTLPNICGPDPSKIKKVVQLILQHKNNILIVIGKGA	219
OFOCD	AKLFG--QTISVEEANKLLFKPIDPAPAQIPAEATAARAADLI--KNAKRPVIMLKGAA	225
ScPDC1	ANLVD---LNVPAKLLQTPIDMSLKPNDAAESEKEVIDTILALV--KDAKNPVILADACC	223
	* . : . : : : : : : : : : : : : : * : : : .	
Hs2-HPCL	YAHAEESIKKLVEQYKLPFLPTPMGKGVDPDNHPYCVGAARSRALQFADVIVLFGARLW	285
ScYEL020C	KN--SHEIRRLVNTFNLPFLPTPMAKGI VPDSSPLNVSSARSQALKIADIVLVLGARLW	277
OFOCD	YAQCDEIRALVEETGIPFLPMGMAKGLLPDNPQSAATAAFALAQDCVCLGARLW	285
ScPDC1	RHDVKAETKKLIDLTQFPFVTPMGKGSIDQHPH-YGGVYVGTLSKPEVKEAVSADLI	282
	. . : * : : * : : * . * : : . * : : : : : :	
Hs2-HPCL	ILHFGLPTRYQPDV-KFIQVDICAEELG-NNVKPA--VTLLGNIHAVTKQLLEELDKTP-	340
ScYEL020C	ILHFGTSPKWNSES-IFIQFDSNPETLGDNNVSPGADLSIWGDIGLSVTALVEELTRQDS	336
OFOCD	LMQHGKGTWGDDELKQYVQIDIQANEMDSNQPIAAP---VVDIKSAVSLRLKALKGAP-	341
ScPDC1	LSVGALLSDFNTGSFSYSYKTKNIVEFHSDHMKIRNATFPQVQMKFVLQKLLTTIADAA-	341
	: . : : : : : : : : : : : : : * : :	
Hs2-HPCL	-WQYPPESKWWKTLREKMSNEAASKELASKKSLP--MNYTTFYHVQEQLEPRD--CFVV	395
ScYEL020C	CWKYSGVK---QETREKIQLNQTRLLRKEKTRGAQ--LNYNQVYGTLRPLIDDYR-TILV	390
OFOCD	----KADAEWTEGALKAKVDGNKAKLAGKMTAETPSGMMNYSNSLGVVRDFMLANPDISLV	397
ScPDC1	-----KGYKPVAVPARTPANAAPVASTP--LKQEWMMWQLGNFLQEGD-VVIA	386
	: : : : : : : : : : : : : : : :	
Hs2-HPCL	SEGANTMDIGRTVLQNYLPRHRLDAGTFGTMGVGLGFAIAAAVVAKDRSPGQWIIICVEGD	455
ScYEL020C	TEGANTMDIARISFPTDAPRRRLDAGTNATMGILGLYALACKASHPELD----VVLIQGD	446
OFOCD	NEGANALDNTRMIVDMLKPRKRLDSGTWGVGMIGMGYCVAAAVT----GKPVIAVEGD	452
ScPDC1	ETGTSAFGINQTTFPNN--TYGISQVLWGSIGFTTGATLGAAFAAEEIDPKKRVLIFIGD	444
	* : : : . : . : : . : * * : : . : : : : * :	
Hs2-HPCL	SAFGFSGMEVETICRYNLPILLVVNNNGIYQGFDTDTWKEMLKFDATAVVPPMCLLPN	515
ScYEL020C	SAFGFSAMEIETAVRCQLALVIVVMNNSGIYHGE-----KDIEGDLPTTALSKN	495
OFOCD	SAFGFSGMELETICRYNLPVTVIIMNNGIYKNE-----ADPQPGVISTRLTR	502
ScPDC1	GSLQLTVQEISTMIRWGLKPYLFLVNLNDGYTIEKL-----IHGPKAQYNEIQG	492
	. : : : * : * * * : : : * * *	
Hs2-HPCL	SHYEQVMTAFGGKGYFVQ---TPEELQKSLRQS---LADTTKP-SLINIMIEPQATRKA	567
ScYEL020C	CRYDLVKGKGLGANDFVN---TISELSRCFQQAVQ---LSRTKRETSVINVIIEPGEQ-KQ	549
OFOCD	GRYDMMMEAFGGKGYVAN---TPAELKAALAEA-----VASGKPCLINAMIDPDAGVES	553
ScPDC1	WDHLSLLPTFGAKDYETHRVATTGEWDKLTQDKSFNDNSKIRMIEIMLVFVADAPQNLVQ	552
	: : : * : : : : : * * . : : : : * : :	
Hs2-HPCL	QDFHWLTRSNN---- 578	
ScYEL020C	IATAWQNKPRL---- 560	
OFOCD	GRIKSLNVVSKVGK 568	
ScPDC1	AKLTAATNAKQ---- 563	
	: .	

**Abb. 3.14: Vergleich der Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* Yel020cp mit TPP-bindenden Proteinen.** Der Sequenzvergleich des ScYEL020C mit Hs2-HPCL, einer Oxalyl-Decarboxylase aus *Oxalobacter formigenes* (Genbank Nr. A55219) und einer Pyruvat-Decarboxylase (Pdc1p) aus *S. cerevisiae* erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms ClustalW (103). Homologien sind nach dem Blossum62-Algorithmus (97) angezeigt. Identische Aminosäuren (\*), stark (:) und schwach konservierte (.) sind markiert. Das identifizierte TPP-Motiv ist in den vier Sequenzen grau unterlegt.

Sowohl in der C-terminalen Hälfte der humanen Lyase 2-HPCL (69) als auch in der des *S.c.YEL020C* wurde ein Sequenzabschnitt mit Homologie zu einer Thiaminpyrophosphat-bindenden (TPP) Domäne detektiert. Die Konsensussequenz dieser Domäne, die am C-

Terminus einiger TPP-abhängigen Decarboxylasen detektiert wurde, wurde als [LIVMF]-[GSA]-X-(5)-P-X-(4)-[LIVMFYW]-X-[LIVMF]-X-G-D-[GSA]-[GSAC] beschrieben (69).

### 3.2.3.2 Subzelluläre Lokalisation

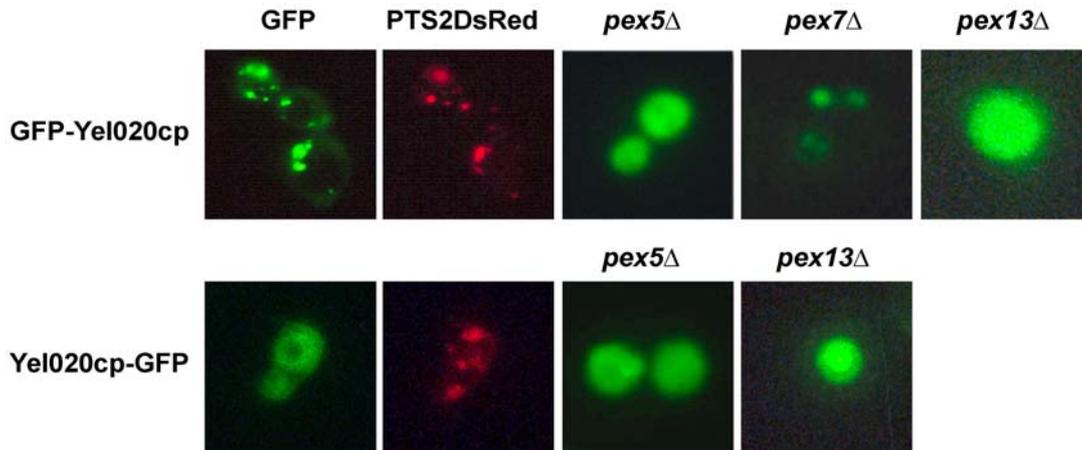
Die zelluläre Lokalisation des Yel020cp wurde durch Doppel-Fluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung untersucht. Dazu wurde zunächst ein Fusionskonstrukt aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem offenen Leserahmen YEL020C erstellt und in den Wildtyp-Stamm BJ1991 transformiert.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde das N- bzw. C-terminale Ende des Yel020cp mit GFP markiert und in den BJ1991PTS2DsRed-Stamm transformiert. Nach Wachstum der Transformanten auf Selektivmedium wurden mehrere Klone auf ölsäurehaltiges Medium überführt, diese zur Induktion der Proliferation der Peroxisomen für mindestens 24 Std. inkubiert und zur Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

Das Fusionsprodukt GFP-Yel020cp zeigte in den Zellen des Wildtyp-Stammes das gleiche punktierte Verteilungsmuster wie der peroxisomale Marker PTS2DsRed (219) (Abb. 3.15). Aus diesem Ergebnis konnte deshalb geschlossen werden, dass es sich bei den grün-markierten Organellen tatsächlich um Peroxisomen handelt. Im Gegensatz zur N-terminalen Fusion des Yel020cp mit GFP konnte bei der C-terminalen Kopplung (Yel020cp-GFP) nur eine diffuse grüne Fluoreszenz des gesamten Cytosols der Zellen beobachtet werden, wohingegen PTS2DsRed die für Peroxisomen typische punktierte Fluoreszenzverteilung zeigte. Eine Blockierung der möglichen PTS1-Sequenz (PRL-COOH) verhinderte den Import des GFP-Fusionsproduktes in die Organellen. Diese Mislokalisierung ließ einen PTS1-abhängigen Import des Proteins in die Peroxisomen vermuten.

Zur Klärung, ob der Import von Yel020cp in die Peroxisomen tatsächlich PTS1-abhängig ist, erfolgte für beide GFP-Fusionskonstrukte eine Transformation in die peroxisomalen Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ* bzw. *pex13Δ*. In den Mutanten *pex5Δ* und *pex13Δ* konnte für die GFP-Yel020cp-Fusion eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz im Cytosol der gesamten Zelle beobachtet werden, wohingegen ein für Peroxisomen typisches punktiertes Fluoreszenzmuster in der *pex7Δ* Mutante zu erkennen war (Abb. 3.15). Die C-terminale Fusion Yel020cp-GFP, die schon in Wildtyp-Zellen zu einer cytosolischen Lokalisation führte, verursachte in den Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ* und *pex13Δ* ebenso eine diffuse Fluoreszenz, was auf eine Mislokalisierung der Proteine im Cytosol der Zellen schließen lässt. Diese Ergebnisse belegten die Vermutung, dass es sich hierbei um einen PTS1-abhängigen Import in die peroxisomale Matrix handelt.

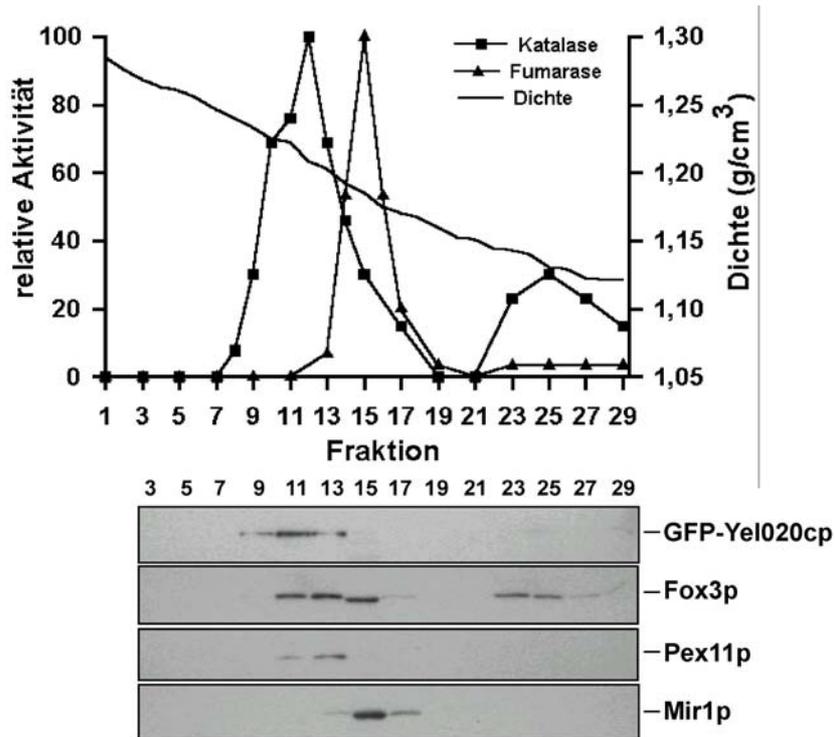
Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten für das Yel020cp einen Pex5p-abhängigen und Pex7p-unabhängigen Import belegen. Eine membranständige Lokalisation konnte nicht gezeigt werden.



**Abb. 315.** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yel020cp, Yel020cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 und der Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ* und *pex13Δ* mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

Die Beobachtungen aus der Fluoreszenzmikroskopie konnten durch subzelluläre Fraktionierung des GFP-Yel020cp bestätigt werden. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation des GFP-Yel020cp wurde ein Organellensediment aus zellfreiem Lysat ölsäureinduzierter Transformanten mittels differentieller Zentrifugation hergestellt und anschließend auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Die biochemische Analyse dieses Dichtegradienten ist in Abb. 3.16 dargestellt.

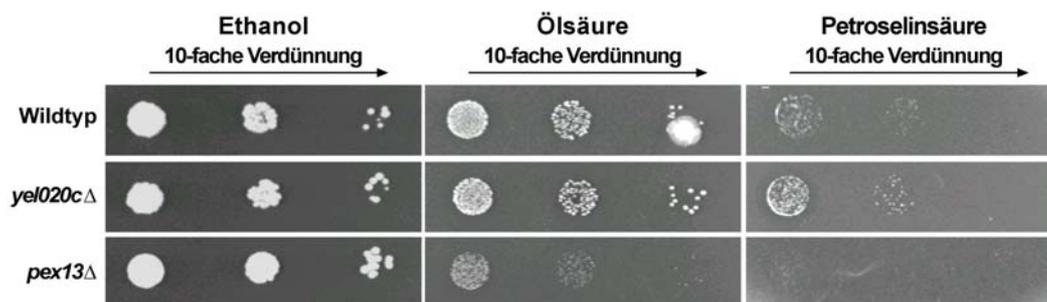
Entsprechend einer peroxisomalen Lokalisation konnte das GFP-Yel020cp-Fusionsprotein in Gradientenfraktionen mit einer für Peroxisomen typischen Dichte von 1.203-1.233 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 9-13) nachgewiesen werden. Mitochondrien waren deutlich davon getrennt, sie lagen bei einer Dichte von 1.185-1.170 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 15-17) vor. Zudem konnte eine Kollokalisierung des Proteins mit dem peroxisomalen Enzym Katalase, dem peroxisomalen Matrixprotein Fox3p und dem peroxisomalen Membranmarker Pex11p nachgewiesen werden, wobei Fox3p z.T. auch in mitochondrialen und cytosolischen Fraktionen detektiert wurde. Die Analyse mittels Dichtegradienten-Zentrifugation belegte somit biochemisch die peroxisomale Lokalisation der potentiellen peroxisomalen 2-Hydroxyphytanoyl-CoA-Lyase in der Hefe.



**Abb. 3.16: Detektion des GFP-Yel020cp in den peroxisomalen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, des mitochondrialen Mir1p und des GFP-Yel020cp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP-Yel020cp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

### 3.2.3.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Funktionelle Peroxisomen können unterschiedliche Kohlenstoffquellen verwerten. Mittels Wachstumstests können Auswirkungen von Deletionen auf die Kohlenstoffverwertung überprüft werden. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der *ye1020cΔ* Mutante auf Agarplatten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4742 sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante untersucht. Letztere diente in diesem Experiment als Kontrolle, da die Mutante einen generellen Wachstumsdefekt auf fettsäurehaltigen Medien, nicht aber auf ethanolhaltigen Medien zeigt (55, 60, 86). Als Kohlenstoffquellen dienten Ethanol und die beiden ungesättigten Fettsäuren Öl- und Petroselinensäure. Den Erwartungen entsprechend zeigte die *pex13Δ* Mutante auf den Fettsäuren kaum Wachstum, aber ein normales Wachstum auf Ethanol-Medium. Ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum konnte sowohl auf den ethanolhaltigen als auch auf den fettsäurehaltigen Agarplatten beobachtet werden (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *yeI020cΔ* und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als einzige Kohlenstoffquelle diente Ethanol, Ölsäure bzw. Petroselinsäure. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurde 2  $\mu$ l einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf die Agarplatte aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurde. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

### 3.2.4 Charakterisierung des YGL184C

#### 3.2.4.1 Identifizierung und Sequenzanalyse

Ein Protein mit starker Ähnlichkeit zu einer Cystathionin- $\beta$ -Lyase (Ygl184cp; Str3p) konnte bereits mit Hilfe der computergestützten Analyse CoSMoS identifiziert werden und wurde wegen seiner PTS1-Signalsequenz (SKL-COOH) am C-terminalen Ende als peroxisomales Matrixprotein eingeordnet (79). Dasselbe Protein wurde mit den Hochsalz-resistenten, potentiellen Membranproteinen des zweiten, modifizierten proteomischen Ansatzes identifiziert und daraufhin eine Membranassoziation vermutet. Ygl184cp wurde deshalb mit GFP markiert, um dessen subzelluläre Lokalisation näher zu untersuchen. Der offene Leserahmen YGL184C mit der Größe von 1398 Bp kodiert für ein 465 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 51,7 kDa (Abb. 3.18). Sequenzanalysen mit Hilfe des Programms Tmpred (112) zeigten, dass das Protein zudem zwei putative Transmembranbereiche zwischen den Aminosäuren 72-93 und 342-361 besitzt.

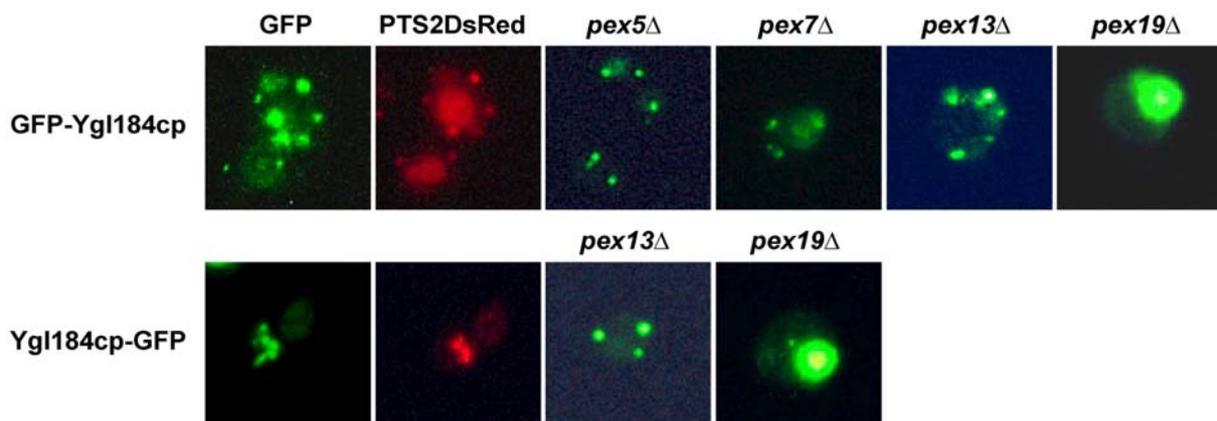
1	<b>ATGCCGATCAAGAGATTAGATACAGTTGTGGTAAATACCGGCTCTCAAAATGACCAACAT</b>	60
1	M P I K R L D T V V V N T G S Q N D Q H	20
61	TCAGCCTCCGTGCCACCGGTGATTTGTCGACTACCTTCAAAGTGGACTTGAATAATGAA	120
21	S A S V P P V Y L S T T F K V D L N N E	40
121	GATGCACAGAACTACGATTATCCAGATCGGGAAACCCGACCAGAAGTGTCTTCAACAC	180
41	D A Q N Y D Y S R S G N P T R S V L Q H	60
181	CAGATTGGTAAGCTTTATCGTGTCCCACAGGAAACGTATTAGCTGTGAGCAGTGGTATG	240
61	Q I G K L Y R V P Q E <u>N V L A V S S G M</u>	80
241	ACGGCGTAGACGTCATCCTCGTGGGCTCGTCTTACTTAACGGCACTGACAACCATACG	300
81	<u>T A L D V I L R G L V L L</u> N G T D N H T	100
301	CCAACAATAATAGCCGCGATGATCTTTATGGAGGCCCAAGGCTGCTGAATTTTTTC	360
101	P T I I A G D D L Y G G T Q R L L N F F	120
361	AAGCAACAGAGTTCATGCAGTCTCTGTTTCATGTGGACACTTCCGATTTTGAAAAGTTCAA	420
121	K Q Q S H A V S V H V D T S D F E K F K	140
421	ACCGTTTTCCAGTCTTTAGATAAAGTTGATTGTGTTCTTCTAGAGTCTCCGACCAATCCG	480
141	T V F Q S L D K V D C V L L E S P T N P	160
481	CTTTGCAAGGTTGTAGATATCCCTAGAATATTACGTTTTGTGAAATGCATATCTCCCGAC	540
161	L C K V V D I P R I L R F V K C I S P D	180
541	ACTACAGTTGTCGTTGATAATACTATGATGAGTGGACTCAATTGTAATCCTCTTCAACTG	600
181	T T V V V D N T M M S G L N C N P L Q L	200
601	AATCCAGGCTGCGATGTCGTATACGAATCTGCTACCAAGTACTTGAATGGTCATCACGAT	660
201	N P G C D V V Y E S A T K Y L N G H H D	220
661	TTGATGGGGGTGTTATTATCAGCAAAACACCAGAAATAGCCTCGAAGCTTTACTTTGTC	720
221	L M G G V I I S K T P E I A S K L Y F V	240
721	ATTAATTCTACAGGAGCTGGATTATCCCAATGGATTCTTGGCTACTTGTGAGGGGCCA	780
241	I N S T G A G L S P M D S W L L V R G L	260
781	AAAACCTAGGAGTTAGATTATATCAACAGCAGAGAAATGCTATGATATTGGCTCATTGG	840
261	K T L G V R L Y Q Q Q R N A M I L A H W	280
841	CTAGAAAATTCATGCGGATTCAAACCTACCAGAACAACAAGGCTACGAAAACCTAGATTT	900
281	L E N S C G F K P T R T N K A T K T R F	300
901	GTTGGATTACGCTCCAACCCGGATTCAAGCTGCATAAATCGTTCAATAATGGCCAGGT	909
301	V G L R S N P D F K L H K S F N N G P G	320
961	GCCGTGTATCCTTCGAAACGGGGTCTTCGAACATTCAAAGAGACTGGTCAGTTCCAAA	1020
321	A V L S F E T G S F E H S K R L V S S K	340
1021	AAACTGAGTATATGGGCTGTGACGGTATCTTTCGGGTGTGTAATTCGCTTCTATCTATG	1080
341	K <u>L S I W A V T V S F G C V N S L L S M</u>	360
1081	CCTTGCAAAATGTCCCATGCTTCCATTGATCCCGAATTAAGGAAAGAGAGAGATTTTCCCT	1140
361	<u>P</u> C K M S H A S I D P E L R K E R D F P	380
1141	GAAGATTGGTTCGTCTTTGCTGCGGTATCGAAAATATAGTAGATTTGAAGAAAGATTTA	1164
381	E D L V R L C C G I E N I V D L K K D L	400
1201	TTAGCGGCGATGGTTGACGCTGATATTATAGAAGTAAGAGAAAATGGCAAAATATCTTTTC	1260
401	L A A M V D A D I I E V R E N G K Y L F	420
1261	AACAAATGAATAAGAACCTAGCTGTGAACACTACCATCGATGACCTGCATAAGCCTTTA	1320
421	N K L N K N L A V N T T I D D L H K P L	440
1321	AGTATTTACGAAGAATTTTACAATCAAGATCTCATCGAAAAGGACTCAGAATTGAATATT	1380
441	S I Y E E F Y N Q D L I R K D S E L N I	460
1381	AAGAGTTCGAAATTGTAA	1398
461	K S <u>S K L</u> ***	465

**Abb. 3.18: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YGL184C-Gens.** \*\*\* markiert das Stop-Codon, das Start-Codon ist fett markiert, eine potentielle PTS1-Sequenz durch einfache Unterstreichung, zwei potentielle Transmembrandomänen durch doppelte Unterstreichungen markiert.

### 3.2.4.2 Subzelluläre Lokalisation

Zur Untersuchung der Lokalisation in der Zelle, wurde zunächst ein Fusionskonstrukt aus dem GFP und dem offenen Leserahmen Ygl184C erstellt und in den Wildtyp-Stamm BJ1991 transformiert.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde das amino- bzw. carboxy-terminale Ende des Ygl184cp mit GFP markiert und in einen BJ1991-Stamm transformiert, in dessen Genom bereits PTS2DsRed (219) integriert worden war. Nach Inkubation von drei Klonen auf ölsäurehaltigem Medium für mindestens 24 Std. konnte die fluoreszenzmikroskopische Analyse vorgenommen werden. Sowohl GFP-Ygl184cp als auch Ygl184cp-GFP zeigten in den Zellen des Wildtyps ein mit dem peroxisomalen Marker PTS2DsRed vergleichbares punktiertes Verteilungsmuster (Abb. 3.19), so dass aus diesem Ergebnis geschlossen wurde, dass es sich bei den markierten Organellen tatsächlich um Peroxisomen handelt.

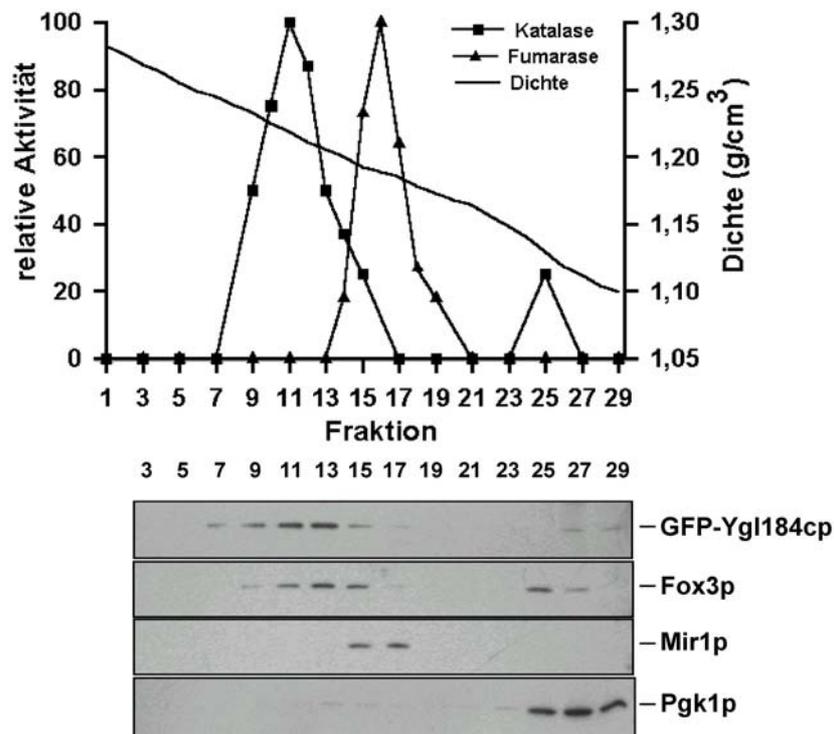


**Abb. 3.19:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Ygl184cp, Ygl184cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des WT BJ1991 und der Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ* und *pex13Δ* und *pex19Δ* mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

Blockierte GFP das potentielle PTS1-Signal (SKL<sub>-COOH</sub>) des Ygl184cp, beeinflusste dies den Import des entsprechenden GFP-Fusionsproduktes in die Organellen offenbar nicht, da keine Mislokalisierung ins Cytosol der Zellen beobachtet wurde. Die erste Vermutung, dass es sich bei diesem Protein um eine membranständige Komponente der Peroxisomen handelt, wurde durch die punktierte grüne Fluoreszenz beider Fusionsprodukte untermauert. Zur Klärung, ob es sich tatsächlich um ein Membranprotein handelt oder ob doch ein Pex5p-abhängiger Import in die Peroxisomen-Matrix möglich ist, wurden beide GFP-Fusionskonstrukte jeweils in die Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ*, *pex13Δ* und *pex19Δ* transformiert. In den für den Import peroxisomaler Matrixproteine defizienten Mutanten *pex5Δ* und *pex7Δ* konnte für die GFP-Ygl184cp-Fusion ein für Peroxisomen typisches punktiertes Fluoreszenzmuster beobachtet werden. Das gleiche punktierte Erscheinungsbild konnte für

beide Fusionsprodukte in der Mutante *pex13Δ* gezeigt werden, die durch die Mislokalisierung PTS1- und PTS2-haltiger Proteine charakterisiert ist (55, 60, 86). In der Mutante *pex19Δ*, die durch fehlende Membranen charakterisiert ist (84), war dagegen für beide Fusionsprodukte eine diffuse grüne Fluoreszenz im Cytosol der Zelle zu erkennen (Abb. 3.19).

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte durch Auftragen eines zellfreien Organellensediments der GFP-Ygl184cp-Fusion auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten und durch isopyknische Zentrifugation (Abb. 3.20).

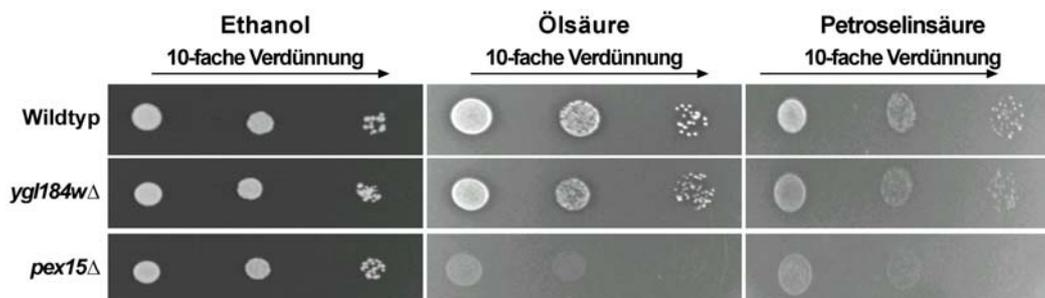


**Abb. 3.20: Detektion des GFP-Ygl184cp in den peroxisomalen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, des mitochondrialen Mir1p, der cytosolisch lokalisierten Pgk1p und des GFP-Ygl184cp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Mir1p, Pgk1p und GFP-Ygl184cp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Mir1p, Pgk1p und GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Das GFP-Ygl184cp-Fusionsprotein konnte mit dem peroxisomalen Enzym Katalase und dem peroxisomalen Markerprotein Fox3p in Fraktionen 9-13 kolokalisiert nachgewiesen werden, wobei sowohl die Katalase als auch Fox3p die mitochondrialen Fraktionen 15-17, markiert durch Mir1p, kontaminierten. Ein geringer Anteil des Proteins verblieb außerdem zusammen mit Anteilen von Fox3p und einem cytosolischen Markerprotein (Pgk1p) in den Fraktionen des Ladevolumens, was auf eine partielle Zerstörung von Peroxisomen während der Aufarbeitung deutet.

### 3.2.4.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zur Analyse einer möglichen Bedeutung des Ygl184cp für die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *ygl184cΔ* in der Lage ist, den entsprechenden Kohlenstoff zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm FY1679 (262) sowie der entsprechenden *pex15Δ* Mutante auf Agarplatten untersucht (Abb. 3.21). Letztere diene in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle, da die Mutante nicht mehr in der Lage ist, Fettsäuren zu verwerten, aber auf ethanolhaltigen Medien ein normales, mit den Wildtyp zu vergleichendes Wachstum zeigt (56). Als Kohlenstoffquellen dienten Ethanol und die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Petroselinensäure.. Auf der Ethanol enthaltende Agarplatte konnte ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum der Mutante *ygl184cΔ* beobachtet werden. Die als Kontrolle dienende Mutante *pex15Δ* zeigte auch hier ein normales Wachstum. Stand Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung, wurde eine dem Wildtyp ähnliche Wachstumsintensität beobachtet (zum Vergleich, siehe auch (79)). Diente jedoch Petroselinensäure als einzige Kohlenstoffquelle, zeigte die Mutante *ygl184cΔ* ein stark vermindertes Wachstum, welches in seiner Intensität zwischen dem Wildtyp und der peroxisomalen Mutante lag. Die *pex15Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß auf beiden fettsäurehaltigen Medien kein Wachstum (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Wachstumsanalyse des Wildtyps FY1679, der Mutante *ygl184cΔ* und der Mutante *pex15Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle diente Ethanol, Ölsäure bzw. Petroselinensäure. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2  $\mu$ l einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

## 3.2.5 Yir034cp/Lys1p ist ein peroxisomales Protein

### 3.2.5.1 Sequenzanalyse

Mit der von Geraghty und Mitarbeitern (79) durchgeführten CoSMoS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Saccharopin-Dehydrogenase 1 (Lys1p, Yir034cp) in den Peroxisomen lokalisiert ist. Da das Protein in unserem zweiten, modifizierten proteomischen Ansatz (Abb. 3.3) ebenfalls nachgewiesen wurde, wurden Experimente zur Feststellung der

Lokalisation (Fluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung) durchgeführt und als Kontrollen betrachtet. Lys1p/Yir034cp besteht aus 373 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 41,3 kDa und eine C-terminale SLK-Konsensus-Sequenz (SRL<sub>-COOH</sub>). Die DNA- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Abb. 3.22 dargestellt.

1	<b>ATG</b> GCTGCCGTCACATTACATCTAAGAGCTGAAACTAAACCCCTAGAGGCACGTGCTGCC	60
1	M A A V T L H L R A E T K P L E A R A A	20
61	TTAACACCTACCACGGTTAAAAAAGCTGATAGCTAAGGGCTTCAAAATATATGTAGAGGAC	120
21	L T P T T V K K L I A K G F K I Y V E D	40
121	AGTCCACAATCTACTTTCAATATTAACGAATATCGTCAAGCAGGTGCCATTATAGTGCCT	180
41	S P Q S T F N I N E Y R Q A G A I I V P	60
181	GCAGGTTTCATGGAAAACCGCTCCACGCGACAGAATCATTATAGGTTTGAAGGAAATGCCT	240
61	A G S W K T A P R D R I I I G L K E M P	80
241	GAAACCGATACTTCCCTCTAGTCCACGAACACATCCAGTTTGCTCACTGCTACAAAGAC	300
81	E T D T F P L V H E H I Q F A H C Y K D	100
301	CAAGCTGGGTGGCAAAATGTCCTTATGAGATTTATTAAGGACACGGTACTCTATATGAT	360
101	Q A G W Q N V L M R F I K G H G T L Y D	120
361	TTGGAATTTTGGAAAATGACCAAGGTAGAAGTTGCTGCCTTTGGATTTTACGCTGGG	420
121	L E F L E N D Q G R R V A A F G F Y A G	140
421	TTGCGAGGTGCAGCCCTTGGTGTAAAGACTGGGCATTCAAGCAAACGCATTCTGACGAT	480
141	F A G A A L G V R D W A F K Q T H S D D	160
481	GAAACTTGCCCTGCAGTGTGCCTTACCCCAATGAAAAGCATTGGTTAAAGATGTTACC	540
161	E D L P A V S P Y P N E K A L V K D V T	180
541	AAAGATTATAAAGAAGCCTTAGCCACCGAGCCAGAAAGCAACCGTGTAAATCATTGGT	600
181	K D Y K E A L A T G A R K P T V L I I G	200
601	GCGCTAGGAAGATGTGGTCCGGTGCATCGATCTGTGACAAAAGTTGGTATTCCAGAT	660
201	A L G R C G S G A I D L L H K V G I P D	220
661	GCTAACATATTTAAATGGGATATCAAAGAAACTTCCCGTGGTGGTCCCTTTGACGAAATT	720
221	A N I L K W D I K E T S R G G P F D E I	240
721	CCACAAGCTGATATTTTATCAATTGTATATATCTATCGAAGCCAATTGCTCCTTTCACT	780
241	P Q A D I F I N C I Y L S K P I A P F T	260
781	AACATGGAGAACTGAATAATCCTAACAGAAGACTAAGGACCGTGGTGGACGTATCAGCA	840
261	N M E K L N N P N R R L R T V V D V S A	280
841	GACACTACCAACCCCTCACAAACCCATCCCAATATACACTGTGGCTACTGTGTTAACAAA	900
281	D T T N P H N P I P I Y T V A T V F N K	300
901	CCTACCGTTCTGGTACTACACTGCCGGCCTAAATTATCTGTCTCTCTATTGATCAC	909
301	P T V L V P T T A G P K L S V I S I D H	320
961	TTGCCTTCTTTGCTGCCAAGAGAAGCTTCAGAATTTTCTCTCATGATCTCTTACCATCT	1020
321	L P S L L P R E A S E F F S H D L L P S	340
1021	TTAGAGCTCCTACCTCAAAGAAAAGCTGCTCCTGTCTGGGTTAGAGCCAAGAAATTGTTCT	1080
341	L E L L P Q R K T A P V W V R A K K L F	360
1081	GATAGACATTGCGCTCGTGTAAAAGATCTTCAAGATTGTAG	1121
361	D R H C A R V K R S <u>S R L</u> -	373

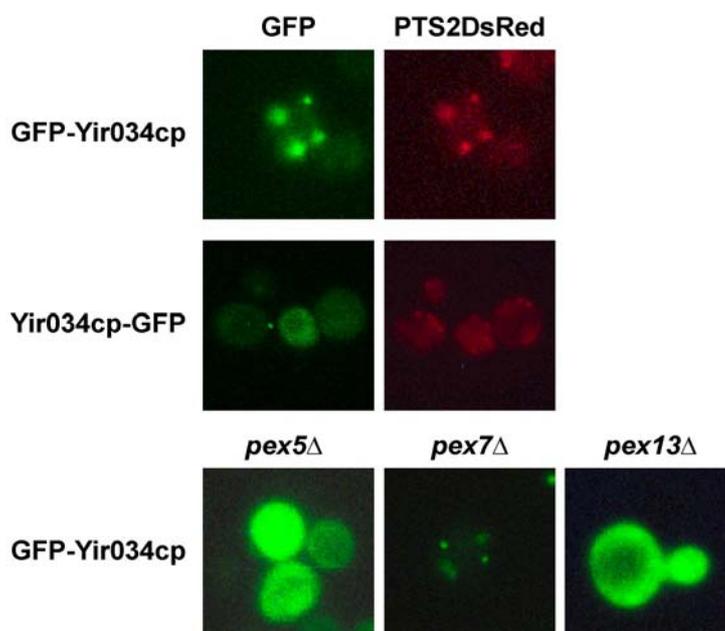
**Abb. 3.22: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YIR034C-Gens. \*\*\*** markiert das Stop-Codon, das Start-Codon ist fett markiert, eine potentielle PTS1-Sequenz ist einfach unterstrichen.

### 3.2.5.2 Subzelluläre Lokalisation

Die zelluläre Lokalisation des Lys1p wurde ebenfalls durch Doppel-Fluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung untersucht.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde das Lys1p an seinem N- bzw. C-terminalen Ende mit GFP markiert und in einen BJ1991-Stamm transformiert, in dessen

Genom das rot-fluoreszierende, peroxisomal lokalisierte Fusionsprodukt PTS2DsRed (219) zuvor integriert worden war. Positive Klone wurden auf ölsäurehaltiges Medium überführt, für mindestens 24 Std. inkubiert und für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Das Fusionsprodukt GFP-Lys1p zeigte in den Zellen des Wildtyp-Stammes ein identisches punktiertes Verteilungsmuster zum peroxisomalen Marker PTS2DsRed (Abb. 3.23). Im Gegensatz zur amino-terminalen Fusion des GFP an das Lys1p konnte bei der Kopplung an den C-Terminus (Lys1p-SRL-GFP) nur eine diffuse grüne Fluoreszenz des Cytosols der Zellen des Wildtyps und ein damit verbundener Importdefekt beobachtet werden, wohingegen der peroxisomale Marker PTS2DsRed die für Peroxisomen typische punktierte Verteilung zeigte. Diese Mislokalisierung lässt einen PTS1-abhängigen Import des Proteins in die Peroxisomen vermuten.

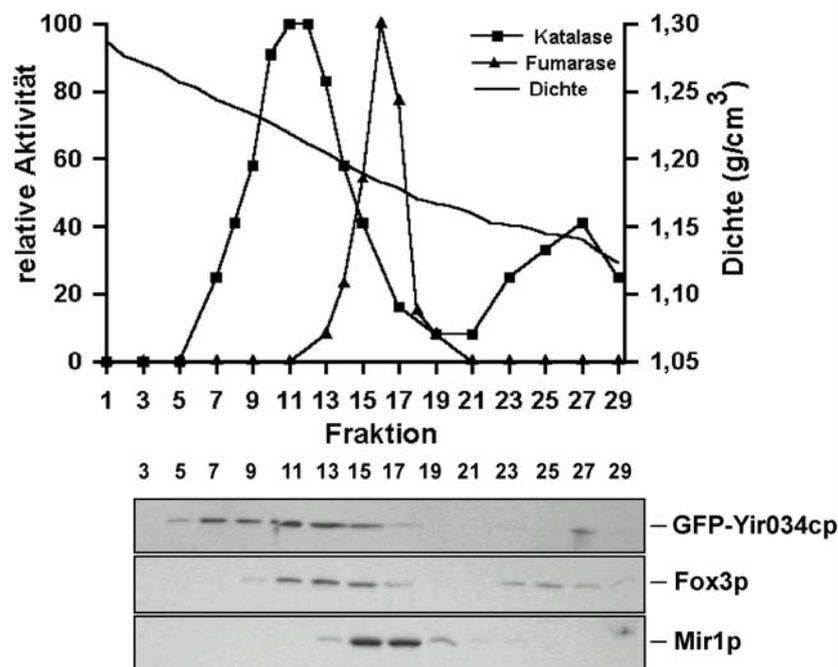


**Abb. 3.23: Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Lys1p (GFP-YIR034cp), Lys1p-GFP YIR034cp-GFP) und des PTS2DsRed in Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 und der Mutanten *pex5*Δ, *pex7*Δ und *pex13*Δ mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie.** Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

Zur näheren Klärung des PTS1-abhängigen Imports von Lys1p in die Peroxisomen, wurde das GFP-Lys1p (mit freien C-Terminus) jeweils in die Mutanten *pex5*Δ, *pex7*Δ und *pex13*Δ transformiert. In der *pex5*Δ Mutante, die keine PTS1-haltigen Proteine importiert, wurde eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz im Cytosol der gesamten Zelle beobachtet. Das gleiche Erscheinungsbild zeigte die Mutante *pex13*Δ, die weder PTS1- noch PTS2-haltige Proteine in die Peroxisomen importiert, wohingegen ein für Peroxisomen typisches punktiertes Fluoreszenzmuster in der *pex7*Δ Mutante (defizient für Proteine mit einer PTS2-Signalsequenz) zu erkennen war (Abb. 3.23). Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass das Protein Lys1p Pex5p-abhängig in die peroxisomale Matrix importiert wird

(Abb. 3.23) und bestätigten zugleich die von Geraghty *et al.* (79) gemachten Beobachtungen einer peroxisomalen Lokalisation.

Die in der Fluoreszenzmikroskopie gemachten Beobachtungen konnten durch eine subzelluläre Fraktionierung des GFP-Lys1p (GFP-YIR034cp) bestätigt werden. Zur Untersuchung des Fusionsproteins wurde ein Organellensediment aus zellfreiem Lysat ölsäureinduzierter Transformanten mittels differentieller Zentrifugation hergestellt und anschließend auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Die biochemische Analyse dieses Dichtegradienten ist in der folgenden Abb. 3.24 dargestellt.



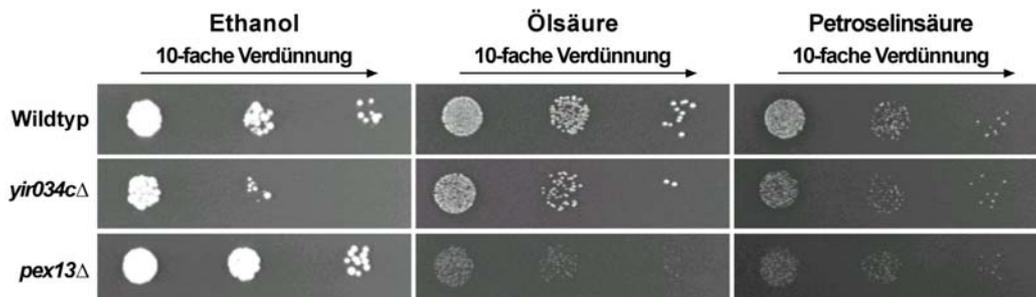
**Abb. 3.24: Detektion des GFP-Yir034cp (GFP-Lys1p) in den peroxisomalen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, des mitochondrialen Mir1p und des GFP-Yir034cp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Mir1p und des GFP-Yir034cp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Mir1p bzw. GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Das GFP-Lys1p-Fusionsprotein konnte in den Gradientenfraktionen 7-15 kolokalisiert zur Katalase detektiert werden. Dabei ist die breite Verteilung über mehrere Fraktionen auffällig. Das peroxisomale Markerproteine Fox3p lag kolokalisiert zu Lys1p in den Fraktionen 11-15 mit einer für Peroxisomen typischen Dichte um 1.219 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 9-13) vor, getrennt

von Mitochondrien, die bei einer Dichte von 1.189-1.178 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 15-17) vorlagen. Lys1p kann somit eine peroxisomale Lokalisation zugeordnet werden.

### 3.2.5.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Für Lys1p wurde bereits beschrieben, dass dessen Mutante in der Lage ist, Ölsäure zu verwerten und dass dieses Protein keine Rolle bei der Biogenese von Peroxisomen spielt (79). Die hier durchgeführten Wachstumsanalysen wurden auf die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen erweitert. Dazu wurde das Wachstumsverhalten der *lys1Δ* Mutante, des Wildtyp-Stammes BY4742 sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante auf ethanolhaltigen und fettsäurehaltigen (Öl- bzw. Petroselinensäure) Agarplatten untersucht (Abb. 3.25). Die *pex13Δ* Mutante diente auch in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle. Sowohl auf der ethanolhaltigen Agarplatte als auch auf Ölsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle konnte ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum der Mutante *lys1Δ* beobachtet werden, was auch den Angaben der Literatur entspricht (79). Die als Kontrolle dienende Mutante *pex13Δ* zeigte erwartungsgemäß normales Wachstum auf Ethanol und kein Wachstum auf Ölsäure. Diente jedoch Petroselinensäure als einzige Kohlenstoffquelle, so zeigte die Mutante *lys1Δ* ein stark vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die *pex13Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß auf beiden fettsäurehaltigen Medien kein Wachstum (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25: Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *yir034cΔ* (*lys1Δ*) und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle diente Ethanol, Ölsäure oder Petroselinensäure. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2 µl einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

Das Ergebnis der Wachstumsanalyse der *lys1Δ* Mutante kann mit der zuvor betrachteten Analyse der Mutante *yg184cΔ* (Abb. 3.21) verglichen werden, die ebenfalls noch in der Lage war, Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Stand aber die schlecht zu verwertende Petroselinensäure als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung, so war das Wachstum so stark vermindert, dass zwar kleine Kolonien beobachtet werden konnten, aber eine deutliche Hofbildung, wie sie der Wildtyp zeigt, nicht erreicht wurde (Abb. 3.25).

### 3.2.6 Ybl015wp/Ach1p ist in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert

#### 3.2.6.1 Sequenzanalyse

Die in beiden reversen Ansätzen detektierte Acetyl-CoA Hydrolase (Ach1p, Ybl015wp) spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Acetyl-CoA- oder CoASH-Menge (146). Das Enzym wird durch das *ACH1*-Gen kodiert und seine Expression durch Glukose reprimiert (147). Aufgrund der Studien von Lee und Mitarbeitern konnte die Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität von Ach1p belegt werden, eine genaue subzelluläre Lokalisation wurde dabei nicht dokumentiert. Die Identifizierung mit Hilfe beider Ansätze deutete auf eine peroxisomale Lokalisation hin. Außerdem ergaben Datenbankanalysen mit Hilfe des Programms psort (111), das Proteine auf ihre subzellulären Orientierung hin untersucht, dass die Acetyl-CoA-Hydrolase eine PTS2-ähnliche Sequenz (RIEFFDKHL) in N-terminaler Nähe zwischen den Aminosäuren 110 und 118 besitzt. Eine Analyse unter Verwendung des Programms MitoProt, das zur speziellen Identifizierung mitochondrialer Zielsteuerungssequenzen dient (33), führte zur Detektion einer solchen aufgrund einer erhöhten Anzahl basischer Aminosäuren am N-Terminus, so dass eine doppelte Lokalisation angenommen werden konnte. Diese Hinweise gaben ausreichend Anlass zur näheren Untersuchung der subzellulären Lokalisation.

```

1      ATGACAATTTCTAATTTGTTAAAGCAGAGAGTTAGGTATGCTCCCTATCTGAAAAAAGTT      60
1      M T I S N L L K Q R V R Y A P Y L K K V      20
61     AAGGAAGCTCACGAGCTTATTCATTGTTCAAGAATGGTCAGTACCTTGGGTGGTCCGGT      120
21     K E A H E L I P L F K N G Q Y L G W S G      40
121    TTTACAGGAGTGGGTACTCCCAAGGCAGTGCCGGAGGCACTGATAGATCACGTGGAGAAG      180
41     F T G V G T P K A V P E A L I D H V E K      60
181    AACAAATTTACAAGGGAAGTTGAGATTCAACCTTTTTGTTGGAGCTTCTGCTGGTCCAGAG      240
61     N N L Q G K L R F N L F V G A S A G P E      80
241    GAAAACCGTTGGGCTGAACACGACATGATCATTAAGAGAGCCCTCATCAAGTAGGGAAA      300
81     E N R W A E H D M I I K R A P H Q V G K      100
301    CCCATTGCAAAGGCAATTAACCGGGTAGAATTGAGTCTTTGATAAACATCTGTCCATG      360
101    P I A K A I N Q G R I E F F D K H L S M      120
361    TTCCCTCAGGATCTGACATACGGGTTCTACACCAGGGAAGAAAAGACAACAAAATCCTT      420
121    F P Q D L T Y G F Y T R E R K D N K I L      140
421    GATTATACTATAATCGAGGCAACGGCCATTAAGAGGACGGGTCTATCGTCCCAGGTCCC      480
141    D Y T I I E A T A I K E D G S I V P G P      160
481    TCTGTCGGTGGTTCTCCAGAATTCATTACAGTCAGTGATAAAGTGATTATTGAGGTTAAC      540
161    S V G G S P E F I T V S D K V I I E V N      180
541    ACGGCTACGCCCTTCGTTTCGAGGGTATTCACGATATAGACATGCCCGTGAACCCACCTTC      600
181    T A T P S F E G I H D I D M P V N P P F      200
601    AGGAAACCATACCCATATCTGAAAGTGGACGACAAGTGGTGTGGACTCCATCCCGGTT      660
201    R K P Y P Y L K V D D K C G V D S I P V      220
661    GATCCTGAAAAGGTTGTTGCGATTGTGGAGTCCACCATGAGGGACCAGGTCCCACCAAAT      720
221    D P E K V V A I V E S T M R D Q V P P N      240
721    ACGCCCTCTGACGACATGTCCAGGGCTATTGCAGGTCAATTTGGTCGAGTTTTTCAGAAAC      780
241    T P S D D M S R A I A G H L V E F F R N      260
781    GAGGTAAAACATGGTAGGCTACCTGAAAACCTGCTGCCTTTACAAAGTGGTATAGGTTAAC      840
261    E V K H G R L P E N L L P L Q S G I G N      280
841    ATTGCTAACCTGTCAATTGAAGGGCTTGCTGGCGCCCAATTCAAGCACTTGACTGTATGG      900

```

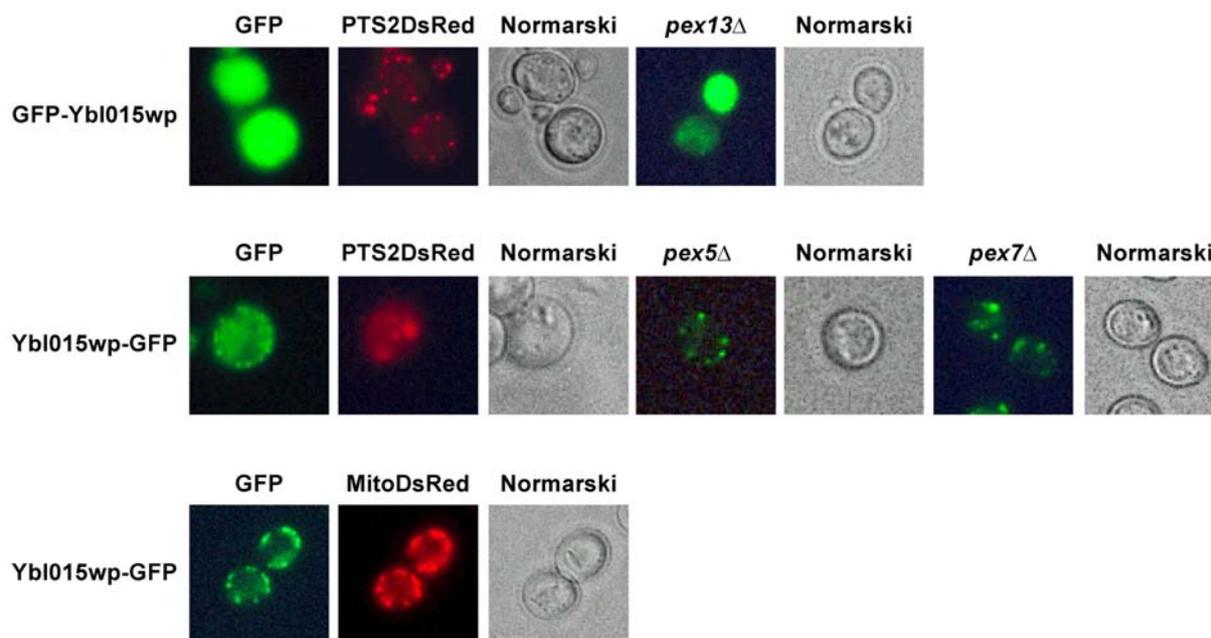
281	I A N A V I E G L A G A Q F K H L T V W	300
901	ACGGAAGTGCAGGACTCGTTCTTGGATCTTTTCGAGAACGGATCTTTGGACTACGCC	909
301	T E V L Q D S F L D L F E N G S L D Y A	320
961	ACTGCTACTTCCGTGAGATTGACTGAAAAGGGTTTCGACAGAGCCTTTGCAAACCTGGGAA	1020
321	T A T S V R L T E K G F D R A F A N W E	340
1021	AATTTCAAACACAGATTGTGTTTGGAGATCTCAAGTTGCTCGAACCAATCCGGAAATGATC	1080
341	N F K H R L C L R S Q V V S N N P E M I	360
1081	CGTAGATTGGGTGTCATCGCCATGAATACCCAGTAGAAGTTGACATTTACGCGCACGCC	1140
361	R R L G V I A M N T P V E V D I Y A H A	380
1141	AATTCTACAAATGTGAATGGTTCCCGTATGTTGAACGGGTTGGGTGGATCTGCTGATTTTC	1164
381	N S T N V N G S R M L N G L G G S A D F	400
1201	TTGAGAAATGCAAAGTTGTCCATCATGCATGCCCCCTCTGCAAGACCAACTAAAAGTAGAC	1260
401	L R N A K L S I M H A P S A R P T K V D	420
1261	CCTACCGGTATCTCTACCATTGTTCCATATGGCCTCTCATGTAGATCAAACCTGAGCATGAC	1320
421	P T G I S T I V P M A S H V D Q T E H D	440
1321	CTGGACATCTTGGTCACTGACCAAGGTTTGGCGGATCTAAGAGGTCTATCGCCTAAGGAA	1380
441	L D I L V T D Q G L A D L R G L S P K E	460
1381	AGAGCCCGTGAAATCATCAACAAGTGTGCTCATCCCGATTATCAAGCTTTGTTGACCGAT	1440
461	R A R E I I N K C A H P D Y Q A L L T D	480
1441	TACTTGGACAGAGCAGAGCATTACGCTAAAAAGCACAATTGCTTGCATGAACCACACATG	1500
481	Y L D R A E H Y A K K H N C L H E P H M	500
1501	CTAAAGAATGCTTTCAAGTCCACACCAACTTAGCTGAAAAGGGTACAATGAAGGTCGAC	1560
501	L K N A F K F H T N L A E K G T M K V D	520
1561	AGCTGGGAACCAAGTTGACTAG	1578
521	S W E P V D ***	526

**Abb. 3.26: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YBL015W-Gens.** \*\*\* markiert das Stop-Codon, das Start-Codon ist fett gekennzeichnet. Eine potentielle PTS2-Sequenz ist doppelt unterstrichen, eine potentielle mitochondriale Zielsteuerungssequenz einfach unterstrichen.

### 3.2.6.2 Subzelluläre Lokalisation

Die zelluläre Lokalisation des Ach1p wurde durch Doppel-Fluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung untersucht.

Das carboxy- bzw. amino-terminale Ende des Ybl015wp wurde für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit GFP gekoppelt. Diese Konstrukte wurden entweder in einen BJ1991-Stamm transformiert, der bereits das rot-fluoreszierende, peroxisomal lokalisierte Fusionsprodukt PTS2-DsRed (219) enthielt, oder in einen BJ1991-Stamm eingebracht, in dessen Genom zuvor ein mitochondrialer Marker, gekoppelt an das rot-fluoreszierende Protein (MitoDsRed) (168) integriert worden war.

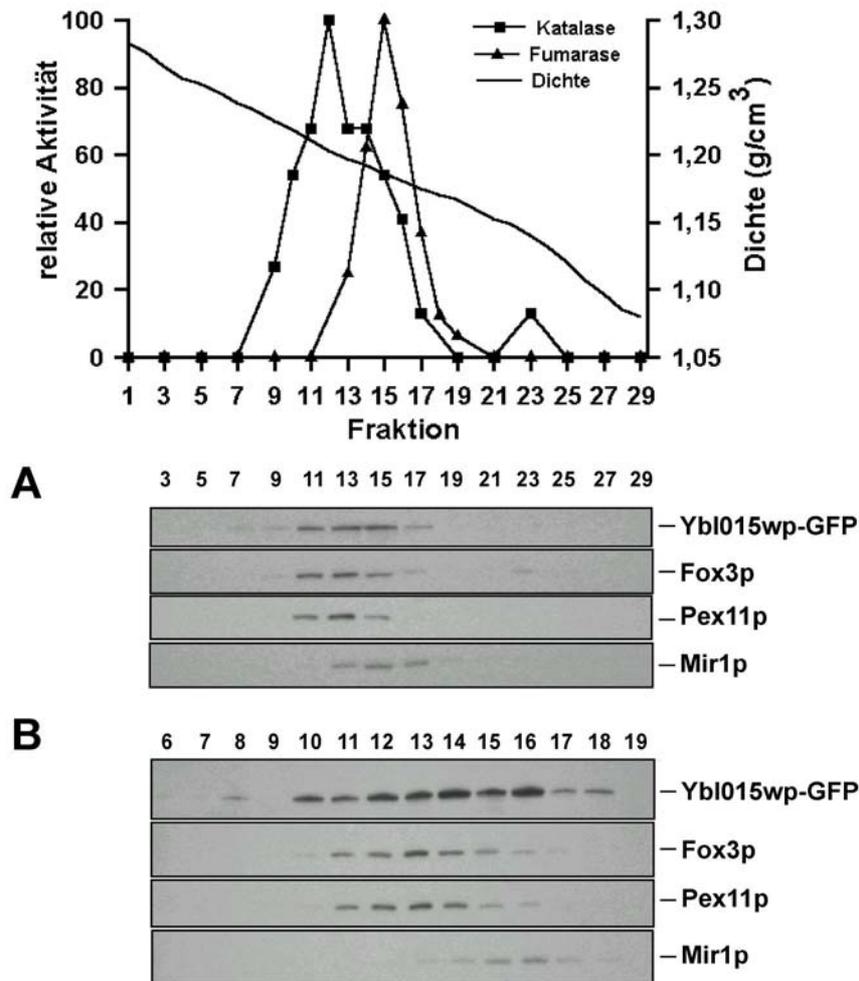


**Abb. 3.27: Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Ybl015wp, Ybl015wp-GFP, des PTS2DsRed bzw. MitoDsRed in Zellen des BJ1991 und den Mutanten *pex5Δ*, *pex7Δ* und *pex13Δ* mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie.** Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäure- bzw. ethanolhaltigem Medium.

Für die carboxy-terminale Kopplung des Ybl015wp mit GFP (Ybl015wp-GFP) konnte ein punktiertes grünes Fluoreszenzmuster beobachtet werden, das aber nicht in allen fluoreszierenden Punkten mit dem peroxisomalen Marker PTS2DsRed identisch zu sein schien. Aus diesem Grund wurde eine weitere Kotransformation mit einem mitochondrialen Marker (MitoDsRed) vorgenommen. Hier konnte ein weitgehend identisches Verteilungsmuster fluoreszierender Organellen detektiert werden (Abb. 3.27), so dass eine doppelte Lokalisation sowohl in Peroxisomen als auch in Mitochondrien angenommen wurde.

Zur Klärung, ob Ach1p aufgrund einer PTS2-Signalsequenz abhängig von Pex7p in die peroxisomale Matrix importiert wird, wurden die GFP-Fusionskonstrukte in die Mutanten *pex5Δ* und *pex7Δ* transformiert. Die Mutante *pex5Δ* ist durch die Mislokalisierung PTS1-haltiger Proteine charakterisiert und diente hier als Kontrolle, für *pex7Δ* ist die Mislokalisierung von PTS2-haltigen Proteinen beschrieben worden und sollte ein diffuses Fluoreszenzmuster zeigen. Aber sowohl in *pex5Δ* als auch in *pex7Δ*-Zellen konnte eine punktierte grüne Fluoreszenzverteilung beobachtet werden (Abb. 3.27), was wahrscheinlich auf die zusätzliche mitochondriale Lokalisation zurückzuführen ist, die von den *pex*-Mutanten unbeeinflusst bleibt. Dagegen zeigte das N-terminale Fusionsprodukt GFP-Ybl015wp in den Zellen des Wildtyp-Stammes eine diffuse, über das Cytosol verteilte, grüne Fluoreszenz, die sich deutlich von der punktierten Fluoreszenz des PTS2DsRed oder MitoDsRed (nicht gezeigt) unterschied, deren peroxisomale bzw. mitochondriale Lokalisationen belegt sind. Eine Blockierung der potentiellen PTS2-Signal-Sequenz und einer möglichen

mitochondrialen Signalsequenz durch den GFP-Marker führte in diesem Fall zur Fehllokalisierung des Proteins ins Cytosol der Zellen. Das gleiche diffuse Erscheinungsbild konnte unabhängig davon auch in der *pex13Δ* Mutante beobachtet werden (Abb. 3.27).



**Abb. 3.28: Detektion des Ybl015wp-GFP (Ach1p) in den peroxisomalen und mitochondrialen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch (A und B) auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, des mitochondrialen Mir1p und des GFP-Ybl015wp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte mittels Bestimmung von Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP-Ybl015wp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen sollten durch subzelluläre Fraktionierung der C-terminalen Kopplung Ach1p-GFP (Ybl015wp-GFP), die ein punktiertes Verteilungsmuster zeigte, geklärt werden. Zur Untersuchung des Fusionsproteins wurde auch in diesem Fall ein Organellensediment auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen. Das Ach1p-GFP-Fusionsprotein konnte zunächst

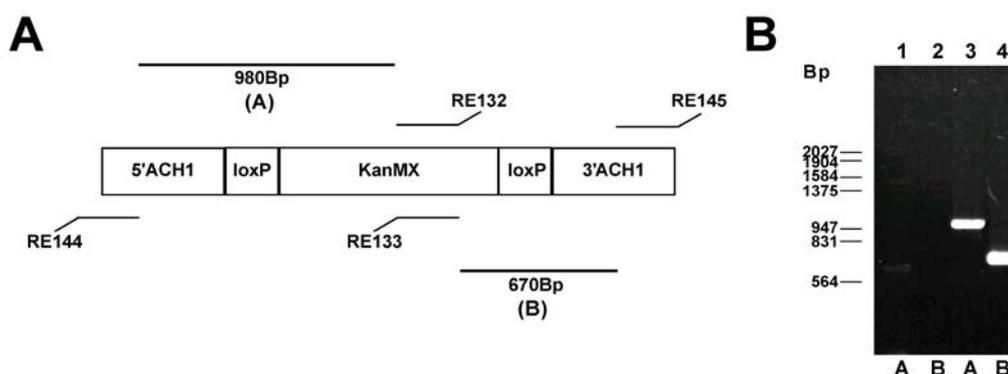
in den Gradientenfraktionen 11-17 immunologisch detektiert werden, kolokalisiert mit den peroxisomalen Markerproteinen Fox3p, Pex11p und Katalase, die in den Fraktionen 11-15 mit einer für Peroxisomen typischen Dichte um  $1.203 \text{ g/cm}^3$  vorlagen, und kolokalisiert mit den mitochondrialen Proteinen Fumarase und Mir1p, die bei einer für Mitochondrien typischen Dichte von  $1.186\text{-}1.175 \text{ g/cm}^3$  (Fraktion 15-17) detektiert werden konnten (Abb. 3.28A). Um eine Vermischung peroxisomaler Proteine mit mitochondrialen Proteinen während der Dichtegradienten-Zentrifugation aufgrund der Enge des Gradienten auszuschließen, wurden in einer zweiten Immunoblot-Analyse alle Fraktionen zwischen Fraktion 6 und 19 auf die peroxisomale und mitochondriale Proteinverteilung hin untersucht (Abb. 3.28B). Das Ach1p-GFP-Fusionsprotein konnte in den Fraktionen 10-18 detektiert werden, wohingegen die peroxisomalen Marker Fox3p und Pex11p in den Fraktionen 10-16 und das mitochondriale Mir1p in den Fraktionen 14-18 zu finden waren. Das Ach1-GFP-Fusionsprodukt erstreckt sich somit über den rein peroxisomalen und über den mitochondrialen Trennungsbereich, was auf eine doppelte Lokalisation sowohl in Peroxisomen als auch in Mitochondrien hindeutet.

Zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurde in diesem Fall die Trennung der Organellen in kontinuierlichen 20-40%-igen Accudenz-Dichtegradienten in Kombination mit isopyknischer Zentrifugation vorgenommen, da dadurch eine noch stärkere Auftrennung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien zu erreichen ist. Die Fraktionierungen brachten jedoch nicht die gewünschte Trennung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien (Daten nicht gezeigt), so dass sie nicht zur Feststellung der Lokalisation beitragen.

### **3.2.6.3 Erstellung und Überprüfung einer Gendeletionsmutante des *ACH1*-Gens**

Zur Überprüfung, ob das *ACH1*-Gen eine essentielle Bedeutung für die Funktion von Peroxisomen im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation hat und ob ein Funktionsausfall zu einem *pex*-Phänotyp führt (63), wurde eine entsprechende Gendeletionsmutante erstellt. Dazu wurde der offene Leserahmen des *ACH1*-Gens (YDR015W) durch ein *KanMX*-Modul ersetzt. Mittels präparativer PCR-Reaktion wurde ein PCR-Fragment hergestellt, das sich aus der loxP-KanMX-loxP-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des *ACH1*-Gens, zusammensetzte. Nach der Transformation des DNA-Fragments in den *S. cerevisiae* Stamm Wildtyp-UTL7A erfolgte mittels homologer Rekombination eine Integration des *KanMX*-Moduls an die Stelle des *ACH1*-Gens im Genom. Resultierende Geneticin<sup>®</sup>-prototrophe Klone wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion auf die korrekte Integration der KanMX-Kassette in den *ACH1*-Lokus überprüft. Hierzu wurde genomische DNA aus potentiellen *ACH1*-Gendeletionsklonen und aus dem Wildtyp UTL7A isoliert. Unter Verwendung der Oligonukleotid-Kombinationen RE132/144 und RE133/145 wurden aus isolierter genomischer DNA von *ACH1*-Mutanten mittels analytischer PCR Teile des *KanMX*-

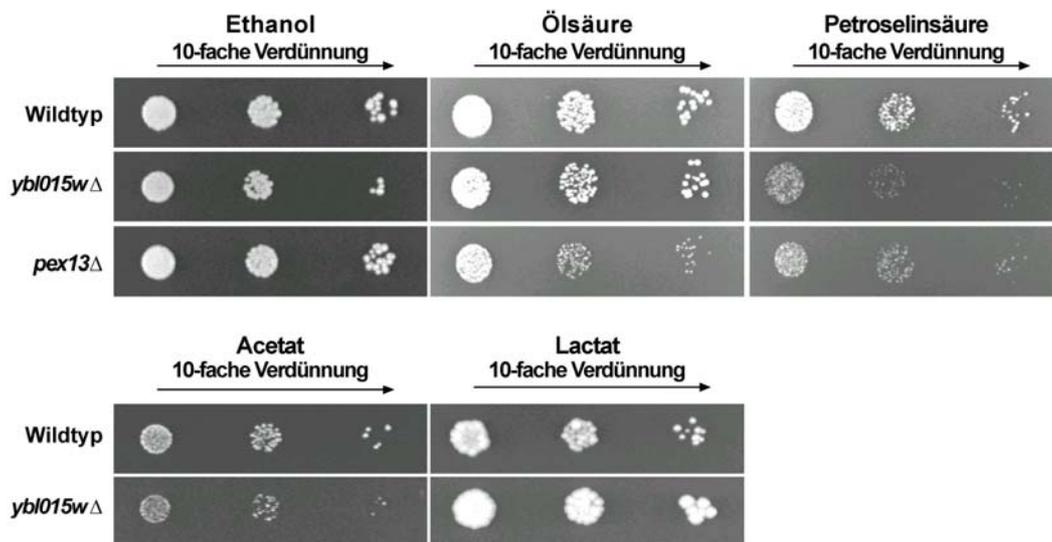
Moduls sowie der 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des *ACH1*-Gens amplifiziert. Abb. 3.29 A+B stellt schematisch den experimentelle Ansatz und die zu erwartenden PCR-Produkte dar. Erwartungsgemäß erfolgte aus genomischer DNA des Wildtyps keine DNA-Amplifikation (Abb. 3.29 B, Spur 1 und 2). Die Verwendung genomischer DNA aus potentiellen *ACH1*-Deletionsklonen führte zu den erwarteten Amplifikationsprodukten der Größe 980 Bp und 670 Bp (Abb. 3.29 B, Spur 3 und 4). Die PCR-Reaktionen bestätigten somit die Substitution des *ACH1*-Gens durch das *KanMX*. Dieser überprüfte Gendeletionsklon wird im Folgenden als *ach1Δ*-Mutante bezeichnet.



**Abb. 3.29: Überprüfung einer Deletion des *ACH1*-Gens mittels PCR.** (A) Schematische Darstellung der mit Hilfe der PCR-Reaktion amplifizierten DNA-Bereiche. DNA-Fragmente mit den Größen 980 Bp (A) und 670 Bp (B) wurden bei korrekter Insertion des *KanMX*-Moduls in den *ACH1*-Lokus unter Verwendung der Oligonukleotide RE132/144 und RE133/145 erwartet. (B) 0,8%-iges Agarose-Gel von jeweils 1/2 Volumen jedes PCR-Ansatzes. Als Vorlagen für die PCR-Reaktionen dienten genomische DNA des Wildtyps UTL7A (Spur1+2) und der potentiellen *ach1Δ*-Mutante (Spur 3+4).

### 3.2.6.4 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zur Analyse einer möglichen Bedeutung des Ach1p für die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *ach1Δ* in der Lage ist, die entsprechenden Kohlenstoffquellen zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm UTL7A sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante untersucht. Als Kohlenstoffquellen dienten Ethanol, die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Petroselinsäure und zusätzlich die zwei nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen Acetat und Lactat. Die Untersuchungen erfolgten durch Wachstumsanalysen auf Agarplatten mit entsprechender Kohlenstoffquelle (Abb. 3.29). Stand Ethanol als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung, so konnte ein geringfügig vermindertes Wachstum der Mutante *ach1Δ* beobachtet werden. Sowohl ölsäurehaltiges Medium als auch Lactat-Medium ließen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum zu. Diente jedoch Petroselinsäure oder Acetat als einzige Kohlenstoffquelle, zeigte die Mutante *ach1Δ* ein stark vermindertes Wachstum. Die *pex13Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß auf den beiden fettsäurehaltigen Medien kein Wachstum (Abb.3.30).



**Abb. 3.30: Wachstumsanalyse des Wildtyps UTL7A, der Mutante *ybl015w*Δ (*ach1*Δ) und der Mutante *pex13*Δ anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle dienen Ethanol, Ölsäure, Petroselinsäure, Acetat bzw. Lactat. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2 µl einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

### 3.2.7 Eine potentielle Serin/Threonin-Kinase konnte in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert nachgewiesen werden

#### 3.2.7.1 Sequenzanalyse

Zusammen mit potentiellen peroxisomalen Membranproteinen des zweiten, modifizierten proteomischen Ansatzes (Abb. 3.3) konnte eine Serin/Threonin-Kinase (YCR091W, KIN82) mit bisher unbekannter zellulärer Rolle und Lokalisation identifiziert werden. Der offene Leserahmen YCR091W mit der Größe von 2163 Bp kodiert für ein 720 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 81,3 kDa. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 3.31 dargestellt. Untersuchungen der Sequenz des YCR091W mit Hilfe der Programme psort (111) und MitoProt (33) führten zur Identifizierung einer mitochondrialen Zielsteuerungssequenz am extremen N-Terminus des Proteins (Abb. 3.31, unterstrichen). Unter Verwendung des Programms TMPred zur Detektion von Transmembranbereichen (112) wurde eine potentielle Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 518 und 537 gefunden (Abb. 3.31, doppelt unterstrichen). Zum Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des YCR091W-Gens mit Sequenzen der NCBI-Nucleotid-Sequenz-Datenbank (113) wurde das Programm BLASTP (6) verwendet. Die Sequenzanalyse zeigte über den gesamten Bereich signifikante Ähnlichkeiten (40% Identität, 36% Ähnlichkeit) zu einem potentiellen Mitglied einer Serin/Threonin-Kinase-Familie: YNR047W. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Proteine mit zwei weiteren Serin/Threonin-Kinasen (Kin3p, Yar018cp und Kin4p, Yor233wp) mit Hilfe des

Programms ClustalW (103) ist in Abb. 3.32 dargestellt. Profilanalysen der Sequenzen der vier Proteine nach Baroich *et al.* (11) führten zur Identifizierung von mindestens einem Protein-Kinase-Motiv in jedem Protein.

```

1      ATGACTCAGCAAGAATACCGTTCCCCCTCACAACGCTTATCCAAGGGGAGGAGCATGTCCG      60
1      M T Q Q E Y R S P S Q R L S K G R S M S                               20
61     CTACCCAAAATATTTGCTCGTAATTTGAGATCTCTGCAAAACAATGCACCTCCTGGCAAA      120
21     L P K I F A R N L R S L Q N N A P P G K                               40
121    AACATCAATGTCAATTGTTTGAACGTCAATTCTTGTTTCGTTGTCGCGAAGCCCAAGCTCA      180
41     N I N V N C L N V N S C S L S A S P S S                               60
181    CAAATTAATATGGCTTGAATGGAACAAGCAAGATCTTCCCATACCGTTTCCCCCTGCAT      240
61     Q I N M A C N G N K Q D L P I P F P L H                               80
241    GTAGAATGCAACGATAGCTGGTCAAGCTCCAACCTAACCAAGTCAAAATCAATGTTTAAAT      300
81     V E C N D S W S S S K L N K F K S M F N                               100
301    CATAACAGATCAAGAGCAGTGGTACTACAGATGCGTCAACTTCAGAAAAAGGTACGCAT      360
101    H N R S K S S G T T D A S T S E K G T H                               120
361    AAGCGTGAACCCGGTTCGACGATACATACAGAGCTGTACAAAAGTTCATTATCGGTGAG      420
121    K R E P R S T I H T E L L Q S S I I G E                               140
421    CCAAATGTCATAGTACTACAAGTAGCACACTTATACCCAATGAGGCGATATGTCCACA      480
141    P N V H S T T S S T L I P N E A I C S T                               160
481    CCTAATGAGATCTCAGGTAGCTCTTCTCCGGACGCGAGTTATTTACCTTTGACATGCC      540
161    P N E I S G S S S P D A E L F T F D M P                               180
541    ACAGACCCGTCATCCTTCCACTCCTAGCTCCCCAAGTTATATAGCAAAGGACAGTAGA      600
181    T D P S S F H T P S S P S Y I A K D S R                               200
601    AACCTGAGTAATGGATCTTGAATGATATTAACGAAAATGAAGAGCTCCAAAATTTCCAT      660
201    N L S N G S L N D I N E N E E L Q N F H                               220
661    AGAAAAATCAGCGAAAATGGCAGTGCCTCCCCCTGGCTAACTTGTCATTATCCAATTCA      720
221    R K I S E N G S A S P L A N L S L S N S                               240
721    CCAATTGATTCGCCAAGGAAAAATAGCGAAACCAGAAAGGATCAAATACCTATGAACATA      780
241    P I D S P R K N S E T R K D Q I P M N I                               260
781    ACACCACGTTTAAGGAGGGCCGCTTCCGAACCGTTCAATACGGCAAAGGATGGGTTAATG      840
261    T P R L R R A A S E P F N T A K D G L M                               280
841    CGGGAAGATTACATTGCCTTGAAAACAACCTCCAAGCTTGGGAGATATTGTAGAACCGAGG      900
281    R E D Y I A L K Q P P S L G D I V E P R                               300
901    AGATCTCGTCGTTTAAAGAACCAAGTCAATTCGGTAACAAGTTCCAAGACATTACTGTGAA      909
301    R S R R L R T K S F G N K F Q D I T V E                               320
961    CCTCAATCCTTCGAAAAAATTAGACTACTTGGCCAAGGTGACGTAGGTAAGGTGATTTTA      1020
321    P Q S F E K I R L L G Q G D V G K V Y L                               340
1021   ATGAGGGAACGCGATACCAACCAGATATTCGCCCTGAAAGTTTTGAATAAACATGAGATG      1080
341    M R E R D T N Q I F A L K V L N K H E M                               360
1081   ATCAAGAGGAAGAAAATTAACGAGTACTCACTGAACAGGAAATTTCTCGCGACAAGTGAT      1140
361    I K R K K I K R V L T E Q E I L A T S D                               380
1141   CATCCATTTATTGTGACTGTATCATTCCTTTCAAACCAAGACTATTTGTATCTCTGT      1164
381    H P F I V T L Y H S F Q T K D Y L Y L C                               400
1201   ATGGAATACTGCATGGGAGGGGAATTCCTTTAGAGCCTTACAAAACAAGAAAAAGTAAATGC      1260
401    M E Y C M G G E F F R A L Q T R K S K C                               420
1261   ATTGCAGAAGAAGATGCGAAGTTTTACGCCAGTGAAGTAGTAGCAGCTTTGGAATATTTA      1320
421    I A E E D A K F Y A S E V V A A L E Y L                               440
1321   CACCTACTGGGCTTCATATACAGAGATTTGAAACCCGAAAACATATTACTGCATCAATCT      1380
441    H L L G F I Y R D L K P E N I L L H Q S                               460
1381   GGTCATGTCATGCTTTCTGACTTTGATTTATCCATCCAAGCAACGGGATCAAAAAACCC      1440
461    G H V M L S D F D L S I Q A T G S K K P                               480
1441   ACCATGAAAGACTCTACGTATTTAGATACAAAAATTTGTTTCAGATGGATTTCAGAATAAT      1500
481    T M K D S T Y L D T K I C S D G F R T N                               500
1501   TCCTTTGTTGGTACTGAAGAGTATTTAGCTCCAGAAGTAAATCAGAGGGAATGGCCACT      1560
501    S F V G T E E Y L A P E V I R G N G H T                               520
1561   GCAGCAGTAGACTGGTGGACTTTAGGAATATTGATTTACGAGATGCTATTTGGCTGTACT      1620

```

521	<u>A A V D W W T L G I L I Y E M L F</u> G C T	540
1621	CCATTTAAAGGAGATAATTCAAATGAAACATTCTTAACATTTTAAACCAAGGACGTCAA	1680
541	P F K G D N S N E T F S N I L T K D V K	560
1681	TTTCCACATGATAAGGAAGTTTCGAAGAATTGTAAAGACCTGATAAAGAACTACTAAAC	1740
561	F P H D K E V S K N C K D L I K K L L N	580
1741	AAAAACGAGGCCAAAAGGCTTGGTTCCAAATCAGGAGCTGCAGACATAAAGAGACATCCC	1800
581	K N E A K R L G S K S G A A D I K R H P	600
1801	TTCTTCAAAAAAGTTCAGTGGTCGTTCTTAAGAAACCAAGACCCCTCTAATACCTGCA	1860
601	F F K K V Q W S F L R N Q D P P L I P A	620
1861	TTAAATGATAACGGCTGCGAACTTCCTTTTATATTGTCTTGCAATAAACACCCGAAAAGG	1920
621	L N D N G C E L P F I L S C N K H P K R	640
1921	AACTCAGTGAGTGAACAGGAAACCAAAATGTTCTGTGAGAAAGTTGCAAACGATGATGAA	1980
641	N S V S E Q E T K M F C E K V A N D D E	660
1981	ATTGATGAGGCTGATCCATTCCATGATTTAATTCTATGAGTTAACGAAGAAAGATCAC	2040
661	I D E A D P F H D F N S M S L T K K D H	680
2041	AATATCTTAACCTACTCTGAAAATTATACCTACGAAAAATCTATACAAAGCAACTGT	2100
681	N I L T Y S E N Y T Y G K I L Y K A T C	700
2101	ACAAGGCCAAGGCATAACAGCTCACATAGAAGTTCTTTAAAGACATCATACCTGAAC	2160
701	T R P R H N S S H R S F F K D I I P E L	720
2161	TAA	2163
	***	

**Abb. 3.31: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des YCR091W-Gens.** \*\*\* markiert das Stop-Codon, das Start-Codon ist fett markiert. Eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz ist einfach, eine potentielle Transmembrandomäne doppelt unterstrichen.

YCR091W	-----MTQOEYRSPSQRLSKG-----RSMPLPKIFARNLRSLOLNAPPQGNIN	43
YNR047W	MAGHHHEHEQERDHEQEHEHDSLQRPTTGSETRRSISFSKLLTR---SWKRNASSSNMS	57
YAR018C	-----	
YOR233W	-----MASVPRRHTYGGNVVTDNRHSLQRNNEILHPIHKNQRKHATFGPYII	48
YCR091W	VNCLNVNSCSSLASPSQINMACNGNKQDLPIPFPLHVECNDSSSSKLNKFKSMFNHR	103
YNR047W	VSSVNLYSDPENSRESHDHNSGSEGGSSRFSLKLSMFQSGNSSKNASAHNSQSLEGDS	117
YAR018C	-----MHRRQFFQEYR	11
YOR233W	<u>GSTLGEGEFGVKLGLWTKASSNEVPKQVAIKLIRRDITIKKADKEIKIYREINALKHLT</u>	108
	. . :	
YCR091W	SKSSG-----TTDASTS-----EKGTHKREPRSTIHT	131
YNR047W	ASSSSKLRVVKPMTSVANASAPPLSPTIPETDVLQTPKMVHIDQHEHEREHNSCGSPI	177
YAR018C	-----PQQQGHPPRSE	24
YOR233W	HPNIIYLEEVLQNSKYIGIVLEFVS-----GGEFYKIQRKRLKESSACRLF	156
	. :	
YCR091W	LLQSSIIGEPNVHSTTSSTLIPNEAICSTPN-----	162
YNR047W	MLSSSSFSPTVARTGTGRRRSPSTPIMPSONNSSSSTSAIRPNNYRHHSQSGQFSSNPN	237
YAR018C	YQVLEEIGRGSFGSVRKVIHIPKLLVRKD-----	55
YOR233W	AQLISGVNMYHYKGLVHRDLKLENLLDKHEN-----	188
	. . . :	
YCR091W	--EISGSSPDALFTFD-MPTDPSS-----FHTPSSPSYIAKDSR	200
YNR047W	FRERAGTVRSSNPFYAYQGLPTHAMSSHDLDGDFQPYANGSGIHFLSTPTSKTNSLTNTK	297
YAR018C	-----IKYGHMNSKERQQ	68
YOR233W	--LVITDFGVNEFFEDNELMKTSCG-----SPCYAAPELVSTKAYEARKA	233
	. :	
YCR091W	NLSNGLNDINENEELQNFRH-----KISENGSAS-----PLANLSL--	238
YNR047W	NLSNLSLNEIKENEVEQEFNNEDEFFHDIPKDLSLKDTLNGSPSRGSSKSPITITQTFPSI	357
YAR018C	LTAECSILSQLKHENIVEFYN-----	89
YOR233W	DVWSCGVILYAMLGLPWDDHENPTGDDIARLYKIITQPLKFPYIITPIPRDLLRRI	293
	. . . :	
YCR091W	-----NSPIDSPRKNSETRKDQIPMNITPR-----LRRAASEP-	271
YNR047W	IVGFDNEYEEDNNNDKHDEKEEQQTTDNKRNLSPKQNGKATHPRIKIPLRRAASEPN	417
YAR018C	-----WDFDEQKEVLYLYMEYCSR-----	108
YOR233W	LVP----NPRRRINLQTIKRHVWLKPHAEFLSIQPNYWEHLQKERPKPPNKGDVGRHS	348
	. . :	
YCR091W	-----FNTAKDGLMR---EDYIALKQPPSLGDIVEPRRSRL	305
YNR047W	GLQLASATSPSTSSARKTSGSSNINDKIPGQSVPPNSFFPQEPSPKISDFEPRRSRL	477
YAR018C	-----GDLSQMIKHYKQ	120
YOR233W	-----TYSSASYSKSRDRNLSLIIESTLEQHRMSQLATSRP	386
	. :	

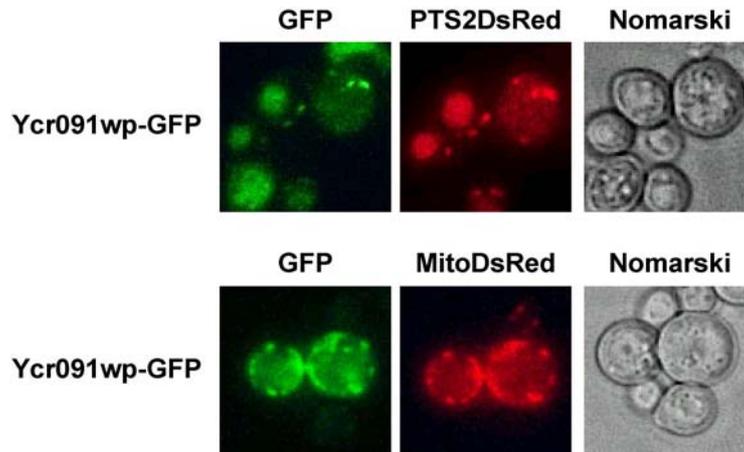
YCR091W	RTKSFNGKFDITVEPQ-SFEKIRLLGQGDVGKVVLMRERDTNQIFALKVNLKHEMIKRR	364
YNR047W	RTKSFNKFQDIMVGPQ-SFEKIRLLGQGDVGKVVFLVREKKTNRVYALKVLSKDEMIKRN	536
YAR018C	EHKYIPEKIVWVILAQL-LTALYKCHYGVELPLTITTYDRMKPPVKGNIVIHRLKPGN	179
YOR233W	ASPTFSTGSKVVLNDTKNDMKESNINGERTSASCRTYRDSKNGNQQTQIEQVSRHSSRGN	446
	: . . . . .	
YCR091W	KIKRVLTEQEILATSHPFIVTLYHSFQTKDYLYLCMEYCMGGEFFRALQTRKSKCIAEE	424
YNR047W	KIKRVLTEQEILATSHPFIVTLYHSFQSEDYLYLCMEYCMGGEFFRALQTRKTKCICED	596
YAR018C	-----IFLSYDDSDYN--INEQVDGHEEVNSNYR-----	207
YOR233W	KHTSVAGLVTIPGSPPTARTRNAPSSKLTTEHVKDDSSQTSFTQEEFHRIGNYHVPRSRPRP	506
	* .. *	
YCR091W	DAKFYASEVVAALEYLHLLGFIYRDLKPENILLHQSGHVMLSDFDLSIQATGSKKPTMK-	483
YNR047W	DARFYASEVTAALEYLHLLGFIYRDLKPENILLHQSGHIMLSDFDLSIQAKDSKVPVVKG	656
YAR018C	DHRVNSGKRGSPMDYSQVV-----VKLGDFGLAKSLETSIQ-----	243
YOR233W	TSYYPGLSRNTADNSLADIPVN--KLGSNRGLTDAKDPVPLNAIHDTNKATISNNSIMLL	564
	. . . . .	
YCR091W	--DSTYLDTKICSDGFRTNSFVGTTEEYLAPEVIRGNNGHTAAVDWWTGLGILYEMLFGCTP	541
YNR047W	SAQSTLVDTKICSDGFRTNSFVGTTEEYIAPEVIRGNNGHTAAVDWWTGLGILYEMLFGCTP	716
YAR018C	-----FATTVYVGTPTYMSEVFLMDQPSPLSDIWSLGCVIFEMCSLHPP	287
YOR233W	S-----EGPAAKTSPVDYHYAIGDLNHGDKPITEVIDKINKDLTHKAAENGFP	613
	. : * . . . .	
YCR091W	FKGDNSNETFSNLTkdVkfPHdKEVSKNCKDLIKKLLNKNEAKRLGSKSGAAD-----	595
YNR047W	FKGDNtNETFTNlKNEVsfPnnNEISrTCKDLIKKLLtKNEskRLGCKMGAA-----	770
YAR018C	FQAKNYLELQTKIKNGKCDTVP-EYYSRGLNAI IHSMIDVNLRTRPSTFELLQD-----	340
YOR233W	ESIDPESTSTILVTKEPTNSTDEdHVESQLENVGHSSNKSDASSDKDKSKKIYEKKRFSFM	673
	. . . . .	
YCR091W	---IKRHPPFFKKVQWSFLRNQDPPLIPALNDNGCELFFILSCNKHPK---RNSVSEQET	648
YNR047W	---VKKHPPFFKKVQWSLLRNQEPPLIPVLSedGYDFAKLSSNKKRQTSQDSHKHLDEQEK	827
YAR018C	---IQIRTARKSLQLERFER-----KLLDYENELTNIKILEKQA-----IEYER	382
YOR233W	SLYSSLNGSRSTVESRtSKGNAPPVSSRNPSGQSNRSNIKITQQQPRNLSDRVFNPDKKI	733
	. . . . .	
YCR091W	KMFCEKVANDDEIDEADPFHDFNSMSLTKKDHNLTYSENYTYGKILYKATCTRPRHNSS	708
YNR047W	NMFEEERVEYDDEVSEDDPFHDFNSMSLMEQDNNSMIYGNTNSYGKIAYTPNSNRSRNS-	886
YAR018C	ELSQLKEQFTQAVEER-----AREVISGKVKVGPESINGYYGKKFAKPAYHWQTRYR-	435
YOR233W	NDNRIRDNAPSyaESENpGRSVRASVMVSTLREENRSELSNEGNNVEAQSTARKVNLFF	793
	: . . . .	
YCR091W	HRSFFKDIPEL	720
YNR047W	HRTFFKR-----	893
YAR018C	-----	
YOR233W	KRRSMRV-----	800

**Abb. 3.32: Vergleich der Aminosäuresequenz des YCR091W mit YNR047W, YAR047W, YOR233W.** Der Sequenzvergleich erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms ClustalW (103). Homologien sind nach dem Blossum62-Algorithmus (97) angezeigt. Identische Aminosäuren (\*), stark (:) und schwach konservierte (.) sind markiert. Protein-Kinase-Motive sind grau unterlegt.

### 3.2.7.2 Subzelluläre Lokalisation

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation mittels Doppelfluoreszenzmikroskopie wurde der offene Leserahmen des YCR091W an seinem C-terminalen Ende mit GFP markiert (als Ycr091wp-GFP bezeichnet) und zusammen mit dem peroxisomalen Marker PTS2DsRed in einen BJ1991-Wildtyp-Stamm transformiert. Parallel zu diesem Experiment wurde eine Kotransformation des GFP-markierten Proteins mit dem mitochondrialen Marker MitoDsRed vorgenommen, um auch eine potentielle mitochondriale Lokalisation untersuchen zu können. Zur Induktion der Proliferation der Peroxisomen wurde ölsäurehaltiges Medium, für die Mitochondrien ethanolhaltiges Medium verwendet. Das Fusionsprodukt Ycr091wp-GFP zeigte in den ölsäureinduzierten Zellen des Wildtyps das gleiche punktierte Verteilungsmuster wie der peroxisomale Marker PTS2DsRed (Abb. 3.33, oben), so dass daraus geschlossen werden konnte, dass es sich bei den markierten Organellen tatsächlich um Peroxisomen handelt. In den mit Ethanol induzierten Zellen konnte ebenfalls ein mit dem rot-fluoreszierenden Mitochondrienmarker identisches Fluoreszenzmuster des Ycr91wp-GFP

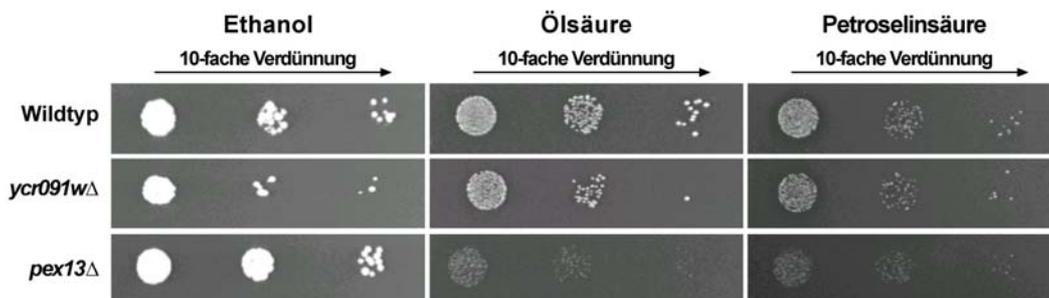
beobachtet werden (Abb. 3.33, unten). Da die Lokalisation des MitoDsRed in den Mitochondrien nachgewiesen ist (168), wurde angenommen, dass es sich bei den markierten Organellen um Mitochondrien handelt. Somit konnte für die Serin/Threonin-Kinase neben einer peroxisomalen auch eine mitochondriale Lokalisation in *S. cerevisiae* angenommen werden.



**Abb. 3.33: Untersuchungen zur Lokalisation des Ycr091wp-GFP, des PTS2DsRed bzw. MitoDsRed in Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie.** Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäure- bzw. ethanolhaltigem Medium.

### 3.2.7.3 Wachstumsanalysen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Um zu überprüfen, inwieweit sich das Fehlen des *YCR091W*-Gens auf das Wachstum der Mutante auswirkt, wurde ihr Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4742 sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante auf Agarplatten mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle untersucht. Als alleinige Kohlenstoffquellen dienten Ethanol, Ölsäure bzw. Petroselinensäure (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *ycr091wΔ* und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle dienten Ethanol, Öl- bzw. Petroselinensäure. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2 µl einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die jeweils links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

Die Abb. 3.34 zeigt ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum der Mutante *ycr091wΔ* auf allen Kohlenstoffquellen. Die *pex13Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß auf beiden fettsäurehaltigen Medien kein Wachstum (Abb. 3.34) (55, 60, 86). Die als peroxisomal und mitochondrial lokalisierte Serin/Threonin-Kinase scheint somit keine Rolle für den Abbau von Ethanol oder von Fettsäuren zu spielen.

### 3.2.8 Identifizierung mitochondrialer Proteine: Yor228cp

#### 3.2.8.1 Sequenzanalyse

Neben neuen peroxisomalen Proteinen wurden auch neue mitochondriale Proteine mittels der reversen genetischen Ansätze identifiziert, da Kontaminationen mit mitochondrialen Proteinen bei der Isolierung von peroxisomalen Proteinen nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten.

1	<b>ATG</b> AATAAGTTGCATGAAGTGCCTCCAGAACCAGTAGACCCTGCTAGTCTCCCTCATGAT	60
1	M I K L H E V P P E P V D P A S L P H D	20
61	GTTAATGCACATAGCCCCGAAGGAGATGGTAATCCTGATAAGAGGAAAAAATATTTGGC	120
21	V N A H S P E G D G N P D K R K K I F G	40
121	ATTCGGTATCCCTTTTCCAGGAGTTCATGTCGGAGATTCTTTGGAACGTGCAAAAAGATT	180
41	I P Y P F S R S S C R R F L W N C Q K I	60
181	TCGGTACTGCCCATGGCATTGTATTTCCTACTACATGCAGCAAATACATTAATCACGCCG	240
61	S V L P M A L Y F P L H A A N T L I T P	80
241	GCAGTATCACCTGATCTGCTCCTGACGACGTTTTAATGATGGTGAGAGAGATTTTACCG	300
81	A V S P D S A P D D V L M M V R E I L P	100
301	TCCATAACTACCAAGCTGTTAGTTGCGGGTATTACTCTCATGTTCTGCTGGTGTCTTG	360
101	S I T T <u>K L L V A G I T L H V S A G V L</u>	120
361	CTCCGAATCGTGAACAACCTGGAACAAGCCAAGAAGAAATAGACATCGACATTTAAAGATA	420
121	<u>L R I V</u> N N W N K P R R N R H R H L K I	140
421	TCGGCCGAACAAGATCTATCCCAAGATTGATTGGTTTAACTGGTGAATTTCTGGCTAT	480
141	S A E Q D L S Q D S I G L T G G I S G Y	160
481	TTATTTGGATTGTATAAGACCTTCCGCATTCTCCACAAGTATTAGTGGATACATCCTT	540
161	L F G L Y K T F R I P P <u>Q V I S G Y I L</u>	180
541	GTTCCCGTCTGATATACCACTTATTAATTATGAAATGGGTGCCGAATTCATCTCTACT	600
181	<u>V P V L I Y H L L I M</u> K W V P N S I S T	200
601	GAGGTGGATTTCCGCCTCTATAAAGCAATTACTATCTAGCAAGAACAGGTGGTGGAAATGG	660
201	E V D F A S I K Q L L S S K N R W W K W	220
661	CTTGGAGGCCTGGTGCCTTAGCTATTCTCCTCGAGTCAGGTGTATATCATATAGGTTG	720
221	L G G L V P L A I L L E S G V Y H I G S	240
721	GGGCTCTGCCGTTATTTTCGGTGTAGAAAAATGACTAGCAGGAAAAATGGTCCACAGCT	780
241	G L C R Y F G V R K M T S R K K W S <u>T A</u>	260
781	ATCAATCTATTAACACTCGTTGGGTTTCGTTCTCTGATTAGATTGATGAAAGAGGATTCT	840
261	<u>I N L L T L V G F V S L I R L M K</u> E D S	280
841	ACGAAACTGGGTCCCAACCAATTCGAAAGCATTTTCAAAAAGATCCGGTTGCTGTTGCAC	900
281	T K L G P N Q F E S I F K K I R L L L H	300
901	GTGAATTAG	909
301	V N***	302

**Abb. 3.35: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YOR228C-Gens. \*\*\*** markiert das Stop-Codon. Das Start-Codon ist fett gekennzeichnet. Die drei potentiellen Transmembranbereiche sind doppelt unterstrichen.

Den mitochondrialen Proteinen wurde ein Protein mit den offenen Leserahmen YOR228C zugeordnet. Der offene Leserahmen YOR228C mit der Größe von 909 Bp kodiert für ein Protein mit 302 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 34,0 kDa.

Nach Datenbankanalysen mit Hilfe des Programms TMpred (112) konnten außerdem drei potentielle Transmembrandomänen zwischen den Aminosäuren 105-124, 173-191 und 259-277 identifiziert werden (Abb. 3.35, doppelt unterstrichen).

```

YOR228C -----
YNR013C MKFSHSLQFNVSPEWSTKYLAISLQKDKLYSNNKHHVVEPHDANDENLPLLA 60

YOR228C -----
YNR013C DASPDDQFYISKFVAALNQLKIDKFYISQETGLIANYNELKDDVMELENTNKATQLFN 120

YOR228C -----
YNR013C QQQHQQLQSVARNRKSQQRQRFSSVSTDSNPSLTDMSIDSAPVIHTQVSNNTTNGN 180

YOR228C -----
YNR013C SMQNLASASVSLSNSNPVYLSPTQHRSLSLKKRLISYITQLSELKDFIELNQTGFSKICK 240

YOR228C -----MIKLHEVPPEP-----V 12
YNR013C KFDKSLNTNLKQNYLNYIKFHSVFNPAVINRIQHHTETILTYASLNKGTTRPSNTFNL 300
          .*: . . *      :

YOR228C DPASLPHDVNAHSPEDGNPDKR----- 35
YNR013C DADRINNDENSSGNEEDEDGNRQEVLDQDAERELSSHLDHVWVERNTVWKDMMNLERK 360
          * . : * * : . * * : : :

YOR228C -----KKIFGIP----- 42
YNR013C YQSAKTDNKKFSLSSQLRPNANITESMAMSSGGAGI IAPSTDLSLTFRELMHLPPKQWL 420
          : : : : *

YOR228C -----YPFSSRSCRR-----FLWNCQKISVLPM 65
YNR013C QFIMGQTSLLKFLITSCFIALLTFNLTPTQDSLQKNCFAILIYASLLWATETIPLFVT 480
          ** : . * : :      : * * : . * : :

YOR228C ALYFPLHAAN--TLITPAVSPDSAPDDVLMVMREILPISITKLLVAGITLHVSAG----- 118
YNR013C SLMIPLLIIVVFPVIKDPITSQPMSPRDSSQFILSTMWSSVIMLLGGFTLAAALSKYNIA 540
          * : * * . . . : * . * : * * : : . : * . * * : . * * : .

YOR228C -----VLLR-----IVNNWNKPRRN-----RHRHLKISAEQDLSQ 148
YNR013C KVLSTHILASAGTNPHFILLTNMFVALFVSMWVSNVAAPVLCYSIVQPLLRTLPRNCSYA 600
          : * *      : * . * .      : * : . :

YOR228C DSIGLTGGISGYLFGLYKTRIPPQVISGYILVP-----VLIYHLL 189
YNR013C KALILGIALASNIGGMSPIASPNIFSIGIMDPSPSWAEWFMIALPVCFICVMAIWVLL 660
          . : : * . . . . : * : . : * : : * * * : * : * : * : * *

YOR228C IMKWVPNSISTEVDFAISIKQLLSSKNRWWKWLGGVLPLAILLESQVYHIG-----SG 241
YNR013C IITFPEPNVKILQLHPSRDPFTLKQWVFLVCIITIVLWCLSNQISGIFGEMGIISIIIP 720
          * : . : * . . : : . : : : * : : . : . : * . . : *

YOR228C LCRYFGRKMTSRKK---WSTAIN----- 262
YNR013C IVVFFGTGLLTSDDFNFMWTIVVLAMGGTTLGKAVSSGGLLSTMAQLIKAQVEHEPIFI 780
          : : * * . : * * .      * : . :

YOR228C -----LLTLVGFVS-----LIRLMKEDSTKLGPNQFESIFKKIRLLLVHN----- 302
YNR013C IVLIFGLVILVMATFVSHTVAAMIIVPLMSEIGSNLPSGDHSRLLVIAALLCSSAMGLP 840
          : * . . * *      : : * * . : : * . . . . : : * * * .

YOR228C -----
YNR013C TSGFPNVTAIMIDEVGDRLTVGTFITRQVPSLLSYAAIVTVGYGILKVMGF 894

```

**Abb. 3.36: Vergleich der Aminosäuresequenz des *S. cerevisiae* YOR228C mit YNR013C.** Der Vergleich erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms ClustalW (103). Homologien sind nach dem Blossum62-Algorithmus (97) angezeigt. Identische (\*), stark (:) und schwach konservierte (.) Aminosäuren sind markiert.

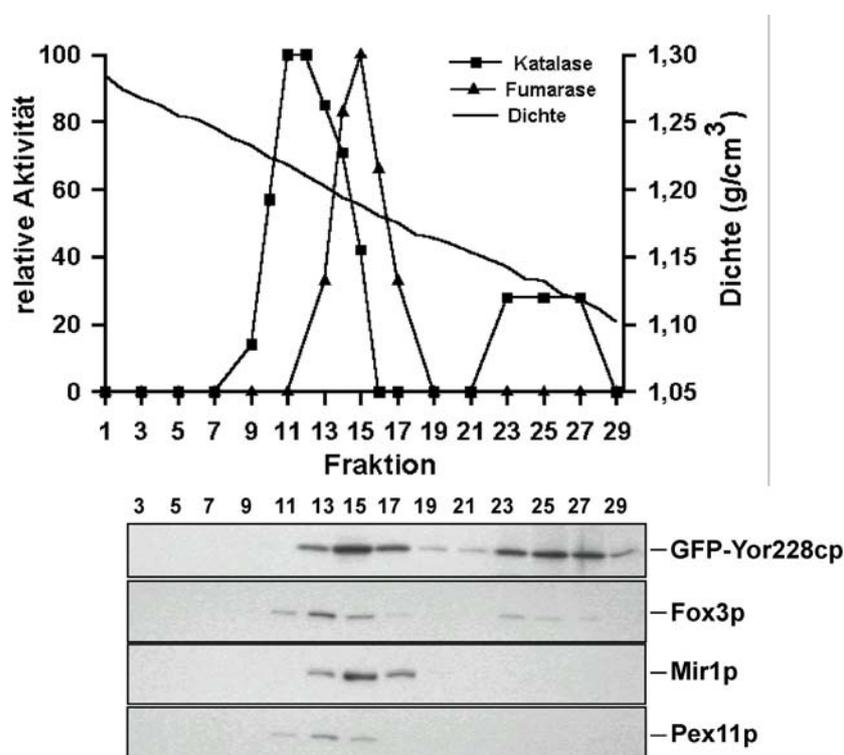
Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des YOR228C-Gens mit Sequenzen einer nr-Datenbank unter Verwendung der Programme BLASTP und FASTA (6) zeigten über den gesamten Sequenzbereich schwache

Ähnlichkeiten (5% Identität, 26% Ähnlichkeit) zu einem Membranprotein Ynr013cp (Abb. 3.36).

### 3.2.8.2 Subzelluläre Lokalisation

Analysen zur Klärung der subzellulären Lokalisation mit Hilfe der Programme psort (111) und MitoProt (33) brachten keine Hinweise. Die zelluläre Lokalisation des Yor228cp wurde daraufhin mittels Doppel-Fluoreszenzmikroskopie und subzellulärer Fraktionierung untersucht. Dazu wurde zunächst ein Fusionskonstrukt aus GFP und YOR228C erstellt und in den Wildtyp BJ1991 transformiert.

Zur weiteren Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurde ein zellfreies Organellensediment der Transformante auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt.

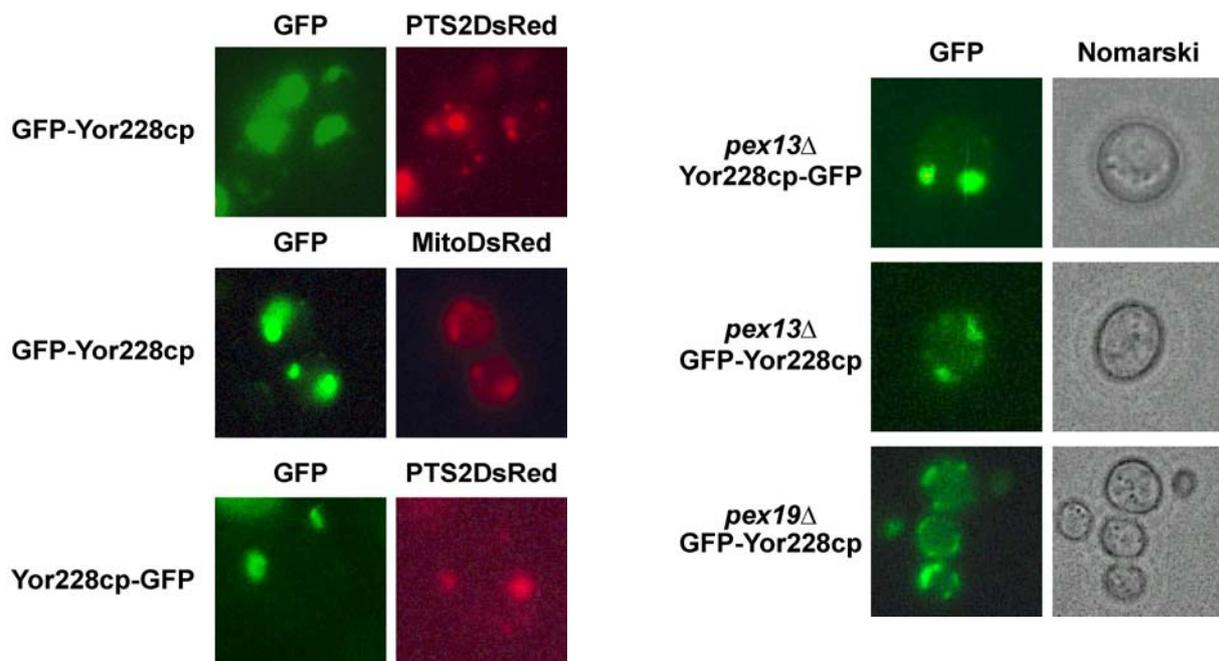


**Abb. 3.37: Detektion des GFP-Yor228cp in den mitochondrialen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, des mitochondrialen Mir1p und des GFP-Yor228cp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP-Yor228cp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Entsprechend einer mitochondrialen Lokalisation konnte der größte Anteil des GFP-Yor228cp in Gradientenfraktionen mit einer für Mitochondrien typischen Dichte von 1.181-

1.189 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 15-17) nachgewiesen werden, nahe zu Peroxisomen, die hauptsächlich in den Fraktionen 11-13 bei einer Dichte von 1.203-1.219 g/cm<sup>3</sup> vorlagen. Zudem konnte eine Kolokalisation des Proteins mit dem mitochondrialen Membranprotein Mir1p und dem mitochondrialen Enzym Fumarase beobachtet werden, obwohl eine vollkommene Trennung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien nicht erreicht werden konnte. In den Fraktionen 23-29 konnte Yor228cp, neben den peroxisomalen Proteinen Katalase und Fox3p, ebenfalls detektiert werden, was auf defekte Organellen hinweist.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde der C- bzw. N-Terminus des Yor228cp mit GFP gekoppelt und in einen BJ1991-Wildtyp-Stamm transformiert, in dessen Genom zuvor das rot-fluoreszierende, peroxisomal lokalisierte Fusionskonstrukt PTS2DsRed (219) oder das mitochondrial lokalisierte MitoDsRed (168) integriert wurde. Nach Wachstum der Transformanten auf dem entsprechenden Selektivmedium wurden jeweils drei Klone auf ölsäure- oder ethanolhaltiges Medium überführt, für mindestens 24 Std. inkubiert und für die anschließende Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.



**Abb. 3.38, links:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yor228cp, Yor228cp-GFP, des PTS2DsRed und des MitoDsRed in Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäure- oder ethanolhaltigem Medium.

**Abb. 3.39, rechts:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yor228cp, Yor228cp-GFP in Zellen der Mutanten *pex13Δ* und *pex19Δ* mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

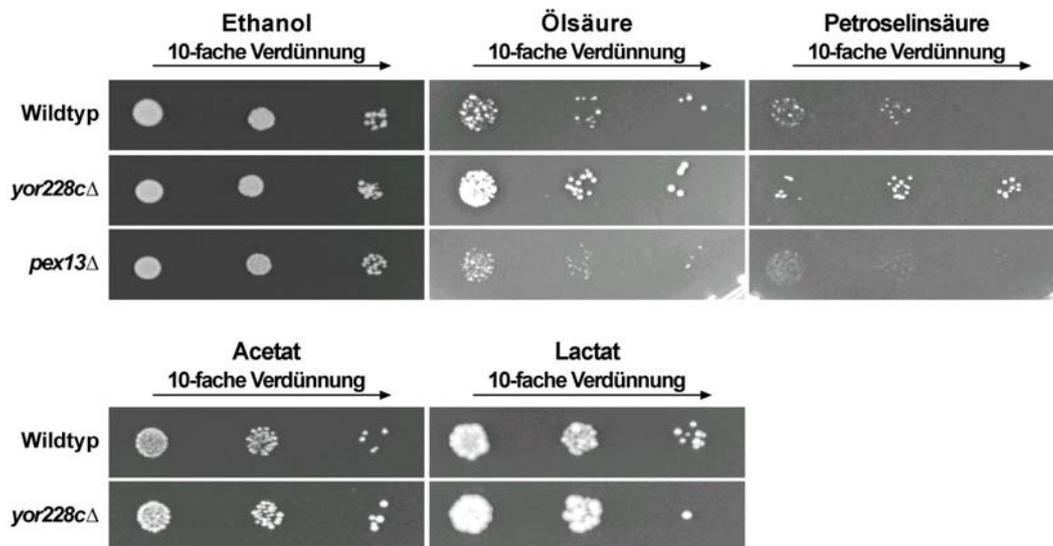
Die Fusionsprodukte GFP-Yor228cp, Yor228cp-GFP und PTS2DsRed zeigten in den Zellen des Wildtyps zwar eine punktierte, aber nicht identische Fluoreszenzverteilung (Abb. 3.38).

Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den rot-markierten Organellen um Peroxisomen handelt, da die Lokalisation des PTS2DsRed in der peroxisomalen Matrix gezeigt wurde (219). Wurde das Fusionsprodukt GFP-Yor228cp mit dem mitochondrialen Marker (MitoDsRed) kotransformiert, konnte in diesen Zellen ein identisches, punktiertes Verteilungsmuster beobachtet werden (Abb. 3.38), das den Schluss zulässt, dass es sich bei den fluoreszierenden Organellen um Mitochondrien handelt.

Sowohl in der peroxisomalen Mutante *pex13* $\Delta$ , die durch die Mislokalisierung PTS1- und PTS2-haltiger Proteine charakterisiert ist (55, 60, 86), als auch in der Mutante *pex19* $\Delta$ , die durch fehlende peroxisomale Membranen gekennzeichnet ist (84), zeigten die GFP-Fusionen ein punktiertes Muster (Abb. 3.39), woraus geschlossen werden kann, dass es sich bei Yor228cp tatsächlich weder um ein peroxisomales Matrix- noch um ein Membranprotein handelt.

### 3.2.8.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zur Analyse einer möglichen Bedeutung des Yor228cp für die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *yor228c* $\Delta$  in der Lage ist, Ethanol, Ölsäure, Petroselinensäure, Acetat bzw. Lactat als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4742 sowie der entsprechenden *pex13* $\Delta$  Mutante auf Agarplatten untersucht.



**Abb. 3.40: Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *yor228c* $\Delta$  und der Mutante *pex13* $\Delta$  anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle diente Ethanol, Ölsäure, Petroselinensäure Acetat oder Lactat. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2  $\mu$ l einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

*pex13Δ* diente auch in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle für ein Wachstum auf Fettsäuren (55, 60, 86). Ein Wachstumsdefekt der Mutante *yor228cΔ* konnte auf keinem der Kohlenstoffquellen beobachtet werden, das Wachstum war mit dem Wildtyp vergleichbar (Abb. 3.40).

### 3.2.9 Ein mitochondrialer Transporter unter Peroxisomen

Die Identifizierung eines Succinat-Fumarat-Transporters (SFC1, YJR095W), der zu einer mitochondrialen Protein-Familie gehört (183) zu der auch die peroxisomalen Proteine Pmp34p (265), Pmp47p (116, 158, 159) und das kürzlich charakterisierte Ant1p (182) zählen, gab Grund zu der Annahme, dass es sich vielleicht um ein weiteres in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiertes Protein handeln könnte. Die Mitglieder dieser Familie sind durch den Besitz einer Konsensussequenz als „Transporter-Motiv“ (P-X-(D/E)-X-(LIVAT)-(RK)-X-(LRH)-(LIVMFY)(QMAIGV) charakterisiert (11).

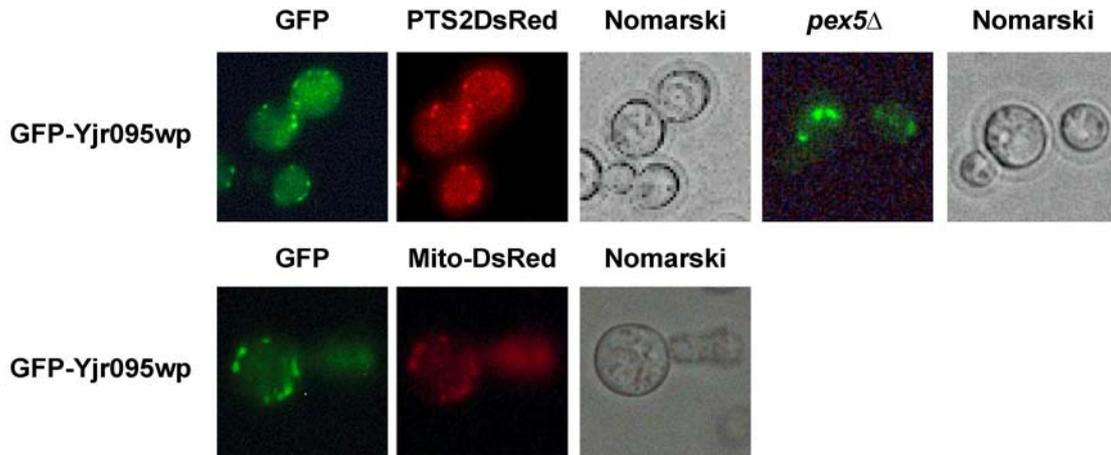
#### 3.2.9.1 Subzelluläre Lokalisation

Die zelluläre Lokalisation des Sfc1p/Yjr095wp wurde deshalb mittels Doppel-Fluoreszenzmikroskopie und subzellulärer Fraktionierung untersucht.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde der N-Terminus des Sfc1p/Yjr095wp, wie zuvor beschrieben, mit GFP markiert und in einen BJ1991-Wildtyp-Stamm transformiert, in dessen Genom zuvor der peroxisomale Marker PTS2DsRed (219) oder das mitochondrial lokalisierte MitoDsRed (168) integriert worden waren. Nachdem die jeweiligen Transformanten auf Selektivmedien gewachsen waren, wurden jeweils drei Klone zur Induktion der Proliferation von Peroxisomen auf ölsäurehaltiges Medium oder von Mitochondrien auf ethanolhaltiges Medium überführt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 24 Std., anschließend konnten die Zellen für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet werden.

Die Fusionsprodukte GFP-Yjr095wp und PTS2DsRed zeigten in den Zellen des Wildtyps zwar jeweils eine Fluoreszenzverteilung in einzelnen Punkten, doch eine Übereinstimmung der Muster war nur schwer festzustellen (Abb. 3.41). Die Lokalisation des PTS2DsRed in den Peroxisomen konnte bereits gezeigt werden (219). Die zusätzlich zu beobachtende cytosolische rote Fluoreszenz kann von Aggregaten des DsRed stammen (10). Wurde eine Kotransformation des GFP-Yjr095wp mit dem mitochondrialen Marker (MitoDsRed) vorgenommen, konnte in diesen Zellen ein identisches, punktiertes Verteilungsmuster beobachtet werden, das Grund zur Annahme gab, dass es sich bei den grünfluoreszierenden Organellen um Mitochondrien handelte (Abb. 3.41). Die Expression des Gfp-Yjr095wp in der peroxisomalen Mutante *pex5Δ*, die durch die Mislokalisierung PTS1-haltiger Proteine

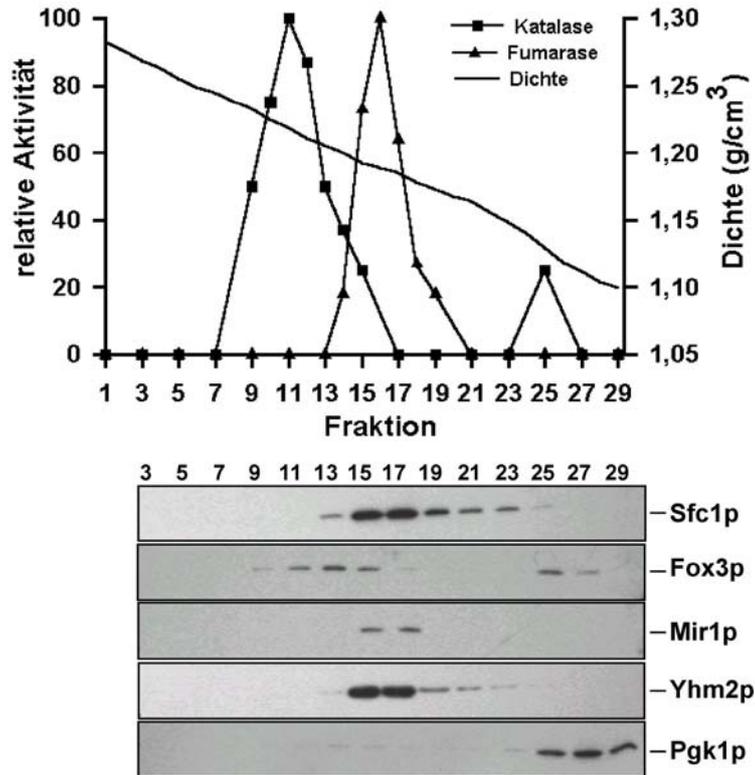
charakterisiert ist (239), zeigte ein punktiertes Muster, woraus geschlossen wurde, dass das Protein, sofern es überhaupt in Peroxisomen lokalisiert ist, nicht über den PTS1-Weg in die Organellen importiert wird.



**Abb. 3.41:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yjr095wp, des PTS2DsRed und des MitoDsRed in Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 und der Mutante *pex5Δ* mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf Ölsäure- oder ethanolhaltigem Medium.

Zur weiteren Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des Sfc1p/Yjr095wp wurde ein zellfreies Organellensediment des Wildtyps BJ1991 auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Dabei sollten Peroxisomen und Mitochondrien voneinander getrennt werden, so dass eine Zuordnung des Sfc1p/Yjr095wp zu einem oder zu beiden Organellen erfolgen kann. Die biochemische und immunologische Analyse dieses Dichtegradienten ist in Abb. 3.42 dargestellt.

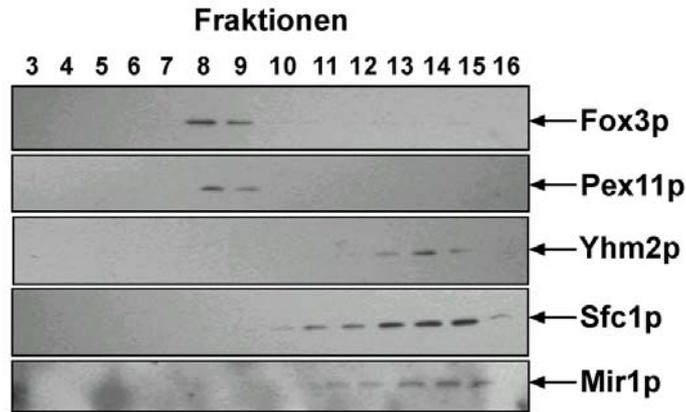
Entsprechend einer mitochondrialen Lokalisation konnte der größte Anteil des Yjr95wp in Fraktionen mit einer für Mitochondrien typischen Dichte von 1.192-1.185 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 15-17) nachgewiesen werden, nahe zu den Peroxisomen, die hauptsächlich in den Fraktionen 9-15 bei einer Dichte von 1.233-1.192 g/cm<sup>3</sup> vorlagen. Obwohl eine Trennung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien nicht vollständig erreicht werden konnte, wurde eine Kolo-kalisation des Proteins mit dem mitochondrialen Membranprotein Mir1p, dem mitochondrialen Transporter Yhm2p (L. Palmieri, persönliche Mitteilung) und dem mitochondrialen Enzym Fumarase beobachtet.



**Abb. 3.42: Detektion des Sfc1p/Yjr095wp in den mitochondrialen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten des BJ1991.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, der mitochondrialen Mir1p, Yhm2p, des Sfc1p/Yjr095wp und der cytosolischen Pgk1p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p, Yhm2p, Sfc1p/Yjr095wp bzw. Pgk1p wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Sfc1p/Yjr095wp, Fox3p, Pex11p, Mir1p, Yhm2p oder Pgk1p inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Mittels 20-40%-igen Accudenz-Gradienten, in denen potentielle peroxisomale Fraktionen (mit mitochondrialen Proteinen kontaminiert) von zuvor durchgeführten Saccharose-Dichtegradienten erneut aufgetrennt wurden, konnte eine noch deutlichere Trennung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien erzielt werden. Dies wurde zum Nachweis des Sfc1p/Yjr095wp ausgenutzt. Die Western-Blot-Analyse dieses Dichtegradienten ist in Abb. 3.43 dargestellt.

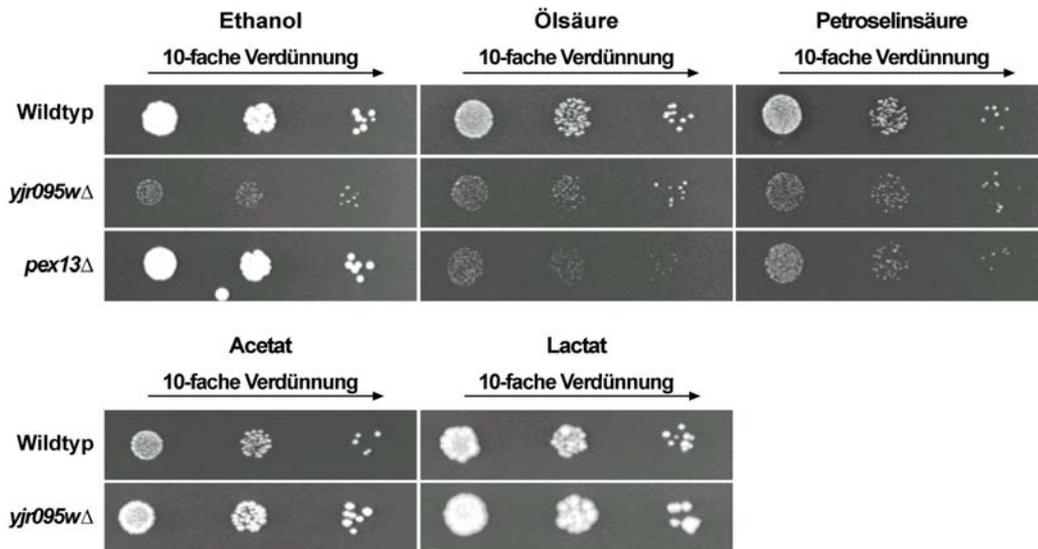
Sfc1p/Yjr095wp/Sfc1p konnte entsprechend einer mitochondrialen Lokalisation zusammen mit den mitochondrialen Markern Mir1p und Yhm2p in den Fraktionen 11-16 detektiert werden, wohingegen die peroxisomalen Proteine Fox3p und Pex11p in den Fraktionen 8 und 9 nachgewiesen wurden. Mit der Wahl dieses zusätzlichen Gradienten wurde eine vollständige Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien erreicht. Doch dieses Ergebnis bestätigte lediglich die bekannte mitochondriale Lokalisation des Succinat-Fumarat-Transporters (183), die aufgrund der Fluoreszenzverteilung zunächst angenommene peroxisomale Lokalisation (Abb. 3.41) konnte nicht verifiziert werden.



**Abb. 3.43: Detektion des Sfc1p/Yjr095wp in den mitochondrialen Fraktionen eines Accudenz-Dichtegradienten des BJ1991.** Peroxisomale Fraktionen aus einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten wurden gemischt und auf einem 20-40%-igen Accudenz-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, der mitochondrialen Mir1p, Yhm2p und des Sfc1p/Yjr095wp analysiert. Zur Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p, Yhm2p und Sfc1p/Yjr095wp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Sfc1p/Yjr095wp, Fox3p, Pex11p, Mir1p bzw. Yhm2p inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

### 3.2.9.2 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Die Hefe *S. cerevisiae* ist in der Lage, sowohl auf Fettsäuren als auch auf Ethanol, Acetat bzw. Lactat zu wachsen. Zur Analyse einer möglichen Bedeutung des Sfc1p/Yjr095wp für die Verwertung der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *yjr095wΔ* in der Lage ist, Ethanol, Ölsäure, Petroselinensäure, Acetat oder Lactat als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4742 sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante auf Agarplatten untersucht. *pex13Δ* diente auch in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle für ein Wachstum auf Fettsäuren (55, 60, 86). Ein Wachstumsdefekt der *yjr095wΔ* Mutante konnte auf ethanol-, ölsäure- und petroselinensäurehaltigen Medien beobachtet werden (Abb. 3.44).



**Abb. 3.44: Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *yjr095wΔ* und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle dienten Ethanol, Ölsäure, Petroselinensäure Acetat bzw. Lactat. Zur Analyse des Wachstums auf Festagarplatten wurden 2  $\mu$ l einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf Platten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

### 3.2.10 Das unbekannte Protein Yhr199cp

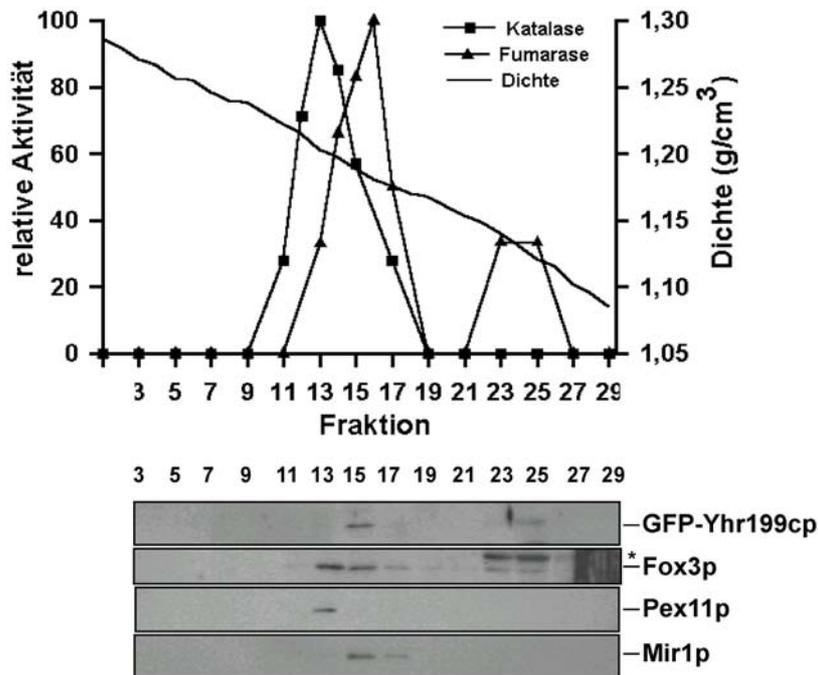
#### 3.2.10.1 Sequenzanalyse

Die Identifizierung dieses Proteins mit dem offenen Leserahmen YHR199C erfolgte im Rahmen des reversen genetischen Ansatzes zur Identifizierung peroxisomaler Membranproteine mittels Hochsalz-Extraktion (Abb. 3.1). Dies führte zu der Annahme, dass eine peroxisomale Membranassoziation vorliegen könnte. Die daraufhin durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenz des Yhr199cp unter Verwendung des Programms TMpred (112) gab aber keine Hinweise auf potentielle Transmembranbereiche. Die vorgenommenen Vergleiche der Aminosäuresequenz des Yhr199cp mit Hilfe des Programms BLASTP (6) zeigten über den gesamten Sequenzbereich eine starke Ähnlichkeit zu dem benachbarten Yhr198c (38% Identität, 61% Ähnlichkeit), dessen zelluläre Rolle und Funktion aber ebenfalls noch ungeklärt ist. In daraufhin durchgeführten *in silico*-Analysen mittels der Programme psort (111) und MitoProt (33) wurde für das Yhr199cp eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz am N-Terminus detektiert (nicht gezeigt). Hinweise für eine peroxisomale Lokalisation wurden nicht gefunden, so dass von einem mitochondrialen Protein ausgegangen werden konnte.

#### 3.2.10.2 Subzelluläre Lokalisation

Die potentielle mitochondriale Lokalisation des bisher unbekanntes Proteins Yhr199cp sollte mittels subzellulärer Fraktionierung und Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurde ein zellfreies Organellsediment der Transformante auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Die biochemische und immunologische Analyse dieses Dichtegradienten ist in Abb. 3.45 dargestellt.



**Abb. 3.45: Detektion des GFP-Yhr199cp in den mitochondrialen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellsediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, des mitochondrialen Mir1p und des GFP-Yhr199cp analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP-Yhr199cp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Mir1p bzw. GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. \* markiert eine Kreuzreaktion des Antikörpers gegen Fox3p in Fraktionen des Ladevolumens.

Eine peroxisomale Lokalisation konnte mittels durchgeführter Dichtegradienten-Zentrifugation nicht festgestellt werden (Abb. 3.45). Dagegen wurde das GFP-Yhr199cp-Fusionsprotein entsprechend einer mitochondrialen Lokalisation in der Gradientenfraktion 15 mit einer für Mitochondrien typischen Dichte von 1.189 g/cm<sup>3</sup> nachgewiesen, kolokalisiert mit dem mitochondrialen Membranprotein Mir1p, aber auch in der Nähe der Peroxisomen, die hauptsächlich bei einer Dichte von 1.203 g/cm<sup>3</sup> (Fraktion 13) vorlagen. Durch die mangelhafte Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien konnte eine partielle Kolokalisation mit dem peroxisomalen Markerprotein Fox3p in der Fraktion 15 beobachtet werden, das auch in den Fraktionen des Ladevolumens zu finden war und dort auf zerstörte Peroxisomen zurückzuführen ist (Fraktionen 23-29). Die Lokalisation des Peroxins Pex11p

beschränkte sich dagegen auf Fraktion 13, in der auch der größte Anteil der Katalase biochemisch detektiert werden konnte (Abb. 3.45).

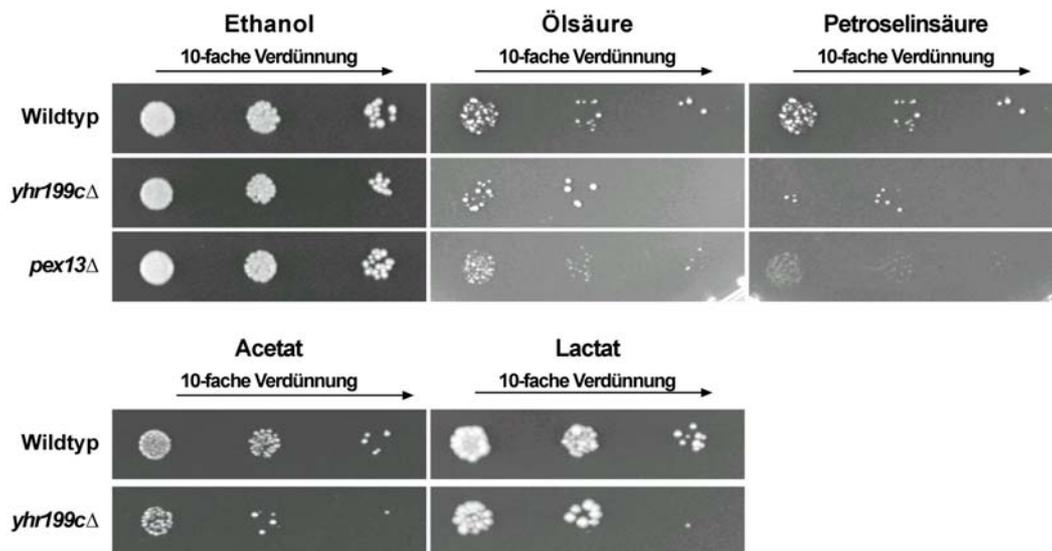
Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde der N- bzw. C-Terminus des Yhr199cp mit GFP markiert und zusammen mit dem peroxisomalen Fluoreszenzmarker PTS2DsRed (219) in einen BJ1991-Stamm transformiert. Nach dem Wachstum von Transformanten auf entsprechendem Selektivmedium, wurden jeweils drei Klone auf ölsäure- oder ethanolhaltiges Medium überführt, für mindestens 24 Std. bei 30°C inkubiert und für die anschließend vorgenommene Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

Die Fusionsprodukte GFP-Yhr199cp und Yhr199cp-GFP zeigten in den Zellen des Wildtyp-Stammes keine eindeutig dokumentierbare Fluoreszenzverteilung. Entweder war ein schwaches cytosolisches, diffuses Leuchten zu beobachten, das mit einer mitochondrialen Lokalisation nicht im Einklang stand (nicht gezeigt) oder die Fluoreszenz war insgesamt so schwach, dass fotografische Aufnahmen unter diesen Bedingungen nicht möglich waren.

### **3.2.10.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen**

Zur Überprüfung, ob das *YHR199C*-Gen für die Funktion von Peroxisomen oder Mitochondrien essentiell ist, wurde eine Gendeletionsmutante erzeugt. Hierzu wurde, wie zuvor bereits beschrieben, das *YHR199C* durch das KanMX-Modul ersetzt und die korrekte Integration in den *YHR199C*-Lokus überprüft (Daten nicht gezeigt). Der erzeugte Gendeletionsklon wird im Folgenden als *yhr199cΔ* bezeichnet. Zur Analyse einer möglichen Bedeutung des Yhr199cp für die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *yhr199cΔ* in der Lage ist, diese zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der *yhr199cΔ* Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm UTL7A sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante untersucht. Letztere diente auch in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle. Als alleinige Kohlenstoffquellen dienten Ethanol, die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Petroselinensäure, Acetat bzw. Lactat (Abb. 3.46).

Die Untersuchung erfolgte durch Wachstumsanalysen auf Agarplatten mit entsprechender Kohlenstoffquelle. Die als Kontrolle dienende *pex13Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß ein normales Wachstum auf Ethanol und ein stark vermindertes Wachstum auf den fettsäurehaltigen Medien. Die Mutante *yhr199cΔ* zeigte leichte Wachstumsdefizite auf den Medien mit Fettsäuren bzw. Acetat, was auf einen Einfluss des Proteins auf den mitochondrialen Stoffwechsel hindeutete (Abb. 3.46).



**Abb. 3.46: Wachstumsanalyse des Wildtyps UTL7A, der Mutante *yhr199cwΔ* und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle dienten Ethanol, Ölsäure, Petroselinensäure, Acetat bzw. Lactat. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2 µl einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf die Agarplatten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

### 3.2.11 Die Acetyl-CoA-Synthetase, ACS1 ist nicht peroxisomal

#### 3.2.11.1 Sequenzanalyse

Das als Acetyl-CoA-Synthetase (ACS1, YAL054C) charakterisierte Protein (41) wurde im Rahmen dieser Arbeit identifiziert, aufgrund einer C-terminalen PTS1-ähnlichen Sequenz (VKL-COOH, Abb. 3.47, unterstrichen) als potentielles peroxisomales Protein betrachtet und deshalb auf seine subzelluläre Lokalisation hin überprüft. Der offenen Leserahmen des ACS1-Gens mit der Größe von 2142 Bp kodiert ein Protein mit 713 Aminosäuren und einer kalkulierten Masse von 79,1 kDa (Abb. 3.47). Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des ACS1-Gens mit Sequenzen der NCBI-Nukleotid-Datenbank (113) unter Verwendung des Programms BLASTP (6) zeigten Ähnlichkeiten zu dem peroxisomalen AMP-bindenden Protein Fat2p (23% Identität, 40% Ähnlichkeit) und zu dem cytosolischen Fat1p (22% Identität, 37% Ähnlichkeit), einer Acyl-CoA-Synthetase (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der DNA-Sequenz des ACS1-Gens führte außerdem zur Identifizierung zweier Start-Codons (Abb. 3.47, fett markiert). De Virgilio und Mitarbeiter (41) postulierten in ihren Studien neben einer peroxisomalen auch eine mitochondriale Lokalisation. Experimentelle Belege für die subzelluläre Lokalisation gab es bisher jedoch noch keine, diese sollten mit der vorliegenden Arbeit geschaffen werden.

1	<b>ATG</b> TCGCCCTCTGCCGTACAATCATCAAAACTAGAAGAACAGTCAAGTAAAATTGACAAG	60
1	M S P S A V Q S S K L E E Q S S E I D K	20
61	TTGAAAGCAAAA <b>ATG</b> TCCCAGTCTGCCGCCACTGCGCAGCAGAAGAAGCAATGAGTAT	120
21	L K A K M S Q S A A T A Q Q K K E H E Y	40
121	GAACATTTGACTTCGGTCAAGATCGTGCCACAACGGCCCATCTCAGATAGACTGCAGCCC	180
41	E H L T S V K I V P Q R P I S D R L Q P	60
181	GCAATTGCTACCCACTATTCTCCACACTTGGACGGGTTGCAGGACTATCAGCGCTGCAC	240
61	A I A T H Y S P H L D G L Q D Y Q R L H	80
241	AAGGAGTCTATTGAAGACCCTGCTAAGTTCTTCGGTTCTAAAAGCTACCCAATTTTAAAC	300
81	K E S I E D P A K F F G S K A T Q F L N	100
301	TGGTCTAAGCCATTGCATAAGGTGTTTATCCAGACCCATAAACGGGCAGGCCCTCCTTC	360
101	W S K P F D K V F I P D P K T G R P S F	120
361	CAGAACAATGCATGGTTCCTCAACGGCCAATTAACGCCTGTTACAACGTGTGTGACAGA	420
121	Q N N A W F L N G Q L N A C Y N C V D R	140
421	CATGCCCTGAAGACTCCTAACAAAGAAAGCCATTATTTTCGAAGGTGACGAGCCTGGCCAA	480
141	H A L K T P N K K A I I F E G D E P G Q	160
481	GGCTATTCCATTACCTACAAGAACTACTTGAAGAAGTTTGTCAAGTGGCACAAGTGCTG	540
161	G Y S I T Y K E L L E E V C Q V A Q V L	180
541	ACTTACTCTATGGGCGTTCGCAAGGGCGATACTGTTGCCGTGTACATGCCTATGGTCCCA	600
181	T Y S M G V R K G D T V A V Y M P M V P	200
601	GAAGCAATCATAACCTTGTGGCCATTTCCCGTATCGGTGCCATTCACTCCGTAGTCTTT	660
201	E A I I T L L A I S R I G A I H S V V F	220
661	GCCGGGTTTCTTCCAACCTTGAGAGATCGTATCAACGATGGGGACTCTAAAGTTGTC	720
221	A G F S S N S L R D R I N D G D S K V V	240
721	ATCACTACAGATGAATCCAACAGAGGTGTAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT	780
241	I T T D E S N R G G K V I E T K R I V D	260
781	GACGCGCTAAGAGAGACCCAGCGGTGAGACACGCTTGGTTTATAGAAAGACCAACAAT	840
261	D A L R E T P G V R H V L V Y R K T N N	280
841	CCATCTGTGCTTCCATGCCCCAGAGATTTGGATTGGGCAACAGAAAAGAAGAATAC	900
281	P S V A F H A P R D L D W A T E K K K Y	300
901	AAGACCTACTATCCATGCACACCCGTTGATTCTGAGGATCCATTATCTTGTGTATACG	909
301	K T Y Y P C T P V D S E D P L F L L Y T	320
961	TCTGGTTCTACTGGTGCSCCAAGGGTGTCAACATTCTACCGCAGGTTACTGTGCGGA	1020
321	S G S T G A P K G V Q H S T A G Y L L G	340
1021	GCTTTGTTGACCATGCGCTACACTTTTGACACTCACCAGAAGACGTTTCTTCACAGCT	1080
341	A L L T M R Y T F D T H Q E D V F F T A	360
1081	GGAGACATTGGCTGGATTACAGGCCACACTTATGTGGTTTATGGTCCCTTACTATATGGT	1140
361	G D I G W I T G H T Y V V Y G P L L Y G	380
1141	TGTGCCATTTGGTCTTTGAAGGGACTCCTGCGTACCCAAATTACTCCCGTTATTGGGAT	1164
381	C A T L V F E G T P A Y P N Y S R Y W D	400
1201	ATTATTGATGAACACAAAGTCAACCAATTTTATGTGCGCCAACTGCTTTGCGTTTGTG	1260
401	I I D E H K V T Q F Y V A P T A L R L L	420
1261	AAAAGAGCTGGTGAATCCTACATCGAAAATCATTCTTAAAATCTTTGCGTTGCTTGGGT	1320
421	K R A G D S Y I E N H S L K S L R C L G	440
1321	TCGFTCGGTGAGCCAATTGCTGCTGAAGTTTGGGAGTGGTACTCTGAAAAAATAGGTAAA	1380
441	S V G E P I A A E V W E W Y S E K I G K	460
1381	AATGAAATCCCCATTGTAGACACCTACTGGCAACAGAATCTGGTTCGCATCTGGTCACC	1440
461	N E I P I V D T Y W Q T E S G S H L V T	480
1441	CCGCTGGCTGGTGGTTACACCAATGAAACCGGGTTCTGCCTCATTCCCTTCTTCGGT	1500
481	P L A G G V T P M K P G S A S F P F F G	500
1501	ATTGATGCAGTTGTTCTTGACCCTAACACTGGTGAAGAACTTAACACCAGCCACGCAGAG	1560
501	I D A V V L D P N T G E E L N T S H A E	520
1561	GGTGTCCCTTGCCGTCAAAGCTGCATGGCCATCATTGCAAGAACTATTGGAATAATCAT	1620
521	G V L A V K A A W P S F A R T I W K N H	540
1621	GATAGGTATCTAGACACTTATTTGAACCTTACCCTGGCTACTATTTCACTGGTGATGGT	1680
541	D R Y L D T Y L N P Y P G Y Y F T G D G	560
1681	GCTGCAAAGGATAAGGATGGTTATATCTGGATTTTGGGTCGTGAGACGATGTGGTGAAC	1740
561	A A K D K D G Y I W I L G R V D D V V N	580

1741	GTCTCTGGTCACCGTCTGTCTACCGCTGAAATTGAGGCTGCTATTATCGAAGATCCAATT	1800
581	V S G H R L S T A E I E A A I I E D P I	600
1801	GTGGCCGAGTGTGCTGTTGTCGGATTCAACGATGACTTGACTGGTCAAGCAGTTGCTGCA	1860
601	V A E C A V V G F N D D L T G Q A V A A	620
1861	TTTGTGGTGTGAAAAACAAATCTAGTTGGTCCACCGCAACAGATGATGAATTACAAGAT	1920
621	F V V L K N K S S W S T A T D D E L Q D	640
1921	ATCAAGAAGCATTTGGTCTTTACTGTTAGAAAAGACATCGGGCCATTTGCCGCACCAAAA	1980
641	I K K H L V F T V R K D I G P F A A P K	660
1981	TTGATCATTTTAGTGGATGACTTGCCCAAGACAAGATCCGGCAAAATTATGAGACGTATT	2040
661	L I I L V D D L P K T R S G K I M R R I	680
2041	TTAAGAAAAATCCTAGCAGGAGAAAAGTACCAACTAGGCGACGTTTCTACATTGTCAAAC	2100
681	L R K I L A G E S D Q L G D V S T L S N	700
2101	CCTGGCATTGTTAGACATCTAATTGATTCGGTCAAGTTGTAA	2142
701	P G I V R H L I D S <u>V K L</u> ***	713

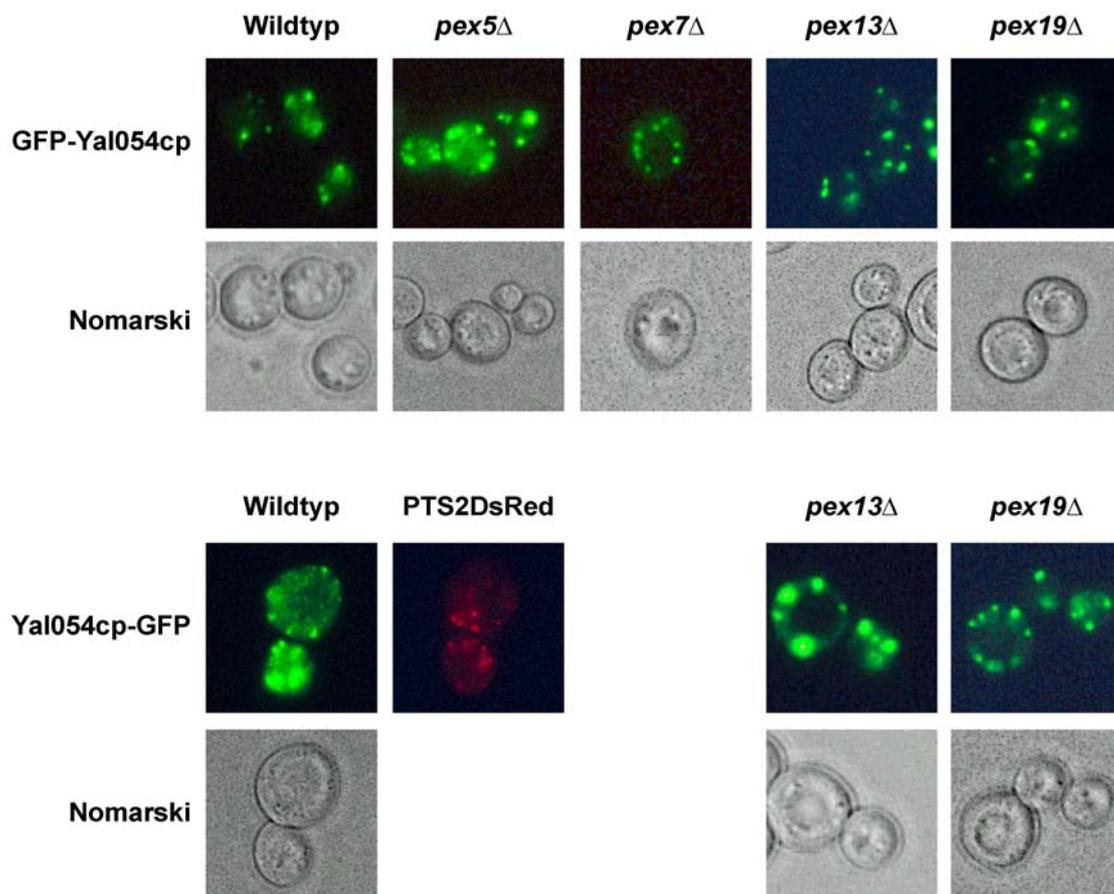
**Abb. 3.47: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des YAL054C-Gens.** \*\*\* kennzeichnet das Stop-Codon. Zwei mögliche Start-Codons sind fett markiert und eine potentielle PTS1-Sequenz ist unterstrichen.

### 3.2.11.2 Subzelluläre Lokalisation

Um die zelluläre Lokalisation der Acetyl-CoA-Synthetase (ACS1, YAL054C) in Zellen von *S. cerevisiae* untersuchen zu können, wurde zunächst ein Fusionskonstrukt aus GFP und dem offenen Leserahmen YAL054C erstellt und in den Stamm BJ1991 transformiert, der bereits den peroxisomal lokalisierten Fluoreszenzmarker PTS2DsRed (219) enthielt. Mit Hilfe von Doppel-Fluoreszenzmikroskopie und subzellulärer Fraktionierung konnte die Lokalisation festgestellt werden.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation wurde der N- bzw. C-Terminus des Yal054cp mit GFP markiert und in den BJ1991-PTS2DsRed-Stamm transformiert. Drei Klone wurden auf ölsäurehaltiges Medium überführt, für mindestens 24 Std. inkubiert und für die Doppel-Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. GFP-Yal054cp zeigte in den Zellen des Wildtyps ein punktiertes Verteilungsmuster (Abb. 3.48). Der peroxisomale Marker PTS2DsRed, dessen peroxisomale Lokalisation belegt ist (219), zeigte ebenfalls ein punktiertes Muster (nicht gezeigt). Jedoch konnten nie Zellen beobachtet werden, die sowohl grüne als auch rote Fluoreszenz zeigten. Deshalb sind in Abb. 3.48 (obere Reihe) nur die grünfluoreszierenden Zellen der GFP-Yal054cp-Fusion gezeigt.

Die GFP-Markierung am C-Terminus (Yal054cp-GFP) verursachte ebenfalls ein punktiertes Verteilungsmuster. Eine Blockierung der vermeintlichen PTS1-Signalsequenz VKL<sub>-COOH</sub>, und eine damit verbundene Mislokalisierung ins Cytosol der Zellen, wie sie zuvor z. B. für die Yor084wp-GFP-Fusion gezeigt werden konnte (Abb. 3.9), wurde in diesem Fall nicht beobachtet. In diesem Fall konnte in denselben Zellen die Fluoreszenz des roten peroxisomalen Markers (PTS2DsRed) punktiert detektiert werden (Abb. 3.48). Ein vollständig identisches Fluoreszenzmuster wurde dabei nicht beobachtet, denn die Anzahl der grünfluoreszierenden Punkte überwog, so dass man aus diesem Ergebnis nicht unbedingt auf eine ausschließlich peroxisomale Lokalisation des GFP-Fusionsproduktes schließen konnte.

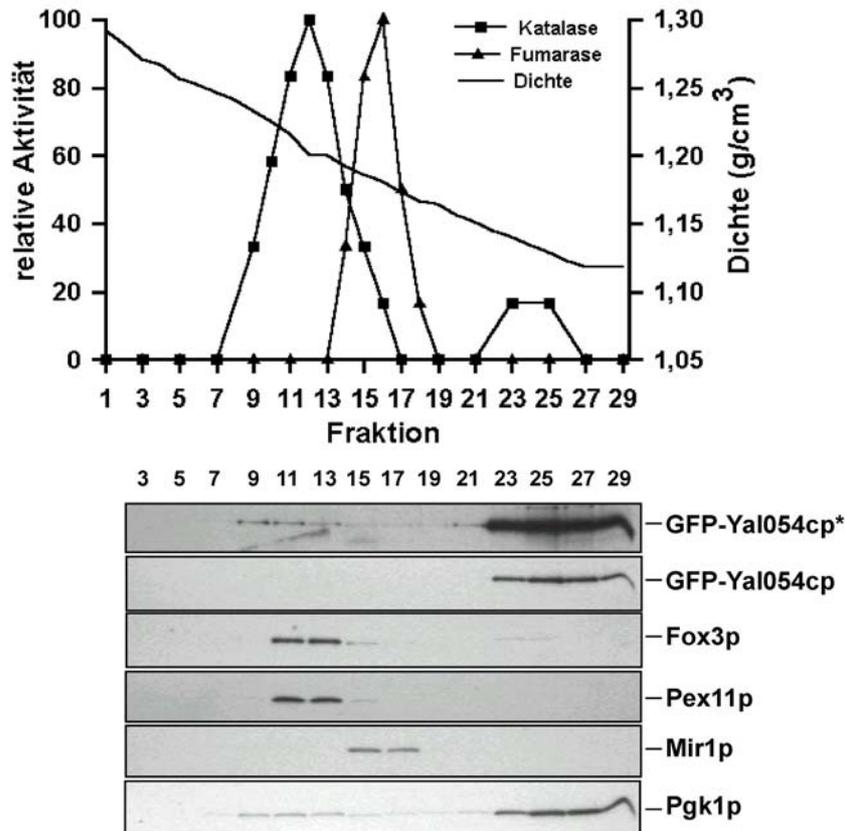


**Abb. 3.48:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yal054cp (obere Reihe), Yal054cp-GFP und des PTS2DsRed (untere Reihe) in Zellen des Stammes BJ1991 und den Mutanten *pex5*Δ, *pex7*Δ, *pex13*Δ und *pex19*Δ mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

Zur Klärung der Frage, ob es sich um ein peroxisomales Protein handelt, wurde die Lokalisation der GFP-Fusionsprodukte in den verschiedenen Import-defizienten peroxisomalen Mutanten *pex5*Δ, *pex7*Δ, *pex13*Δ und *pex19*Δ untersucht. Die Mutante *pex5*Δ ist durch die Mislokalisierung PTS1-haltiger Proteine charakterisiert (239), *pex7*Δ durch die Mislokalisierung von PTS2-haltigen Proteinen (155). *pex13*Δ ist nicht mehr in der Lage, PTS1- und PTS2-haltige Proteine in die peroxisomale Matrix zu importieren (55, 60, 86) und *pex19*Δ fehlt es an peroxisomalen Membranen (84). In allen Mutanten resultierte sowohl die GFP-Yal054cp- als auch die Yal054cp-GFP-Fusion in einer punktierten Verteilung der Fluoreszenz (Abb. 3.48).

Um eine Kolokalisation mit Mitochondrien feststellen zu können, wurde eine Kotransformation mit dem mitochondrialen Marker MitoDsRed (168) vorgenommen. Die Klone wurden ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Aber auch bei diesem Experiment konnte keine Kolokalisation zwischen den GFP-fusionierten Proteinen und dem Organellenmarker detektiert werden (nicht gezeigt).

Parallel zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse erfolgte eine subzelluläre Fraktionierung mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurde ein zellfreies, jedoch mit Cytosol verunreinigtes, Organellensediment der Transformante GFP-Yal054cp auf einen kontinuierlichen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Abb. 3.49 zeigt die biochemische und immunologische Analyse des Dichtegradienten.



**Abb. 3.49: Detektion des GFP-Yal054cp in den Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten der BJ1991-Transformante.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p, Pex11p, des mitochondrialen Mir1p, des GFP-Yal054cp und der cytosolisch lokalisierten Pgk1p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und der mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten, die als Prozentsatz zur Maximalaktivität angegeben sind. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p, Mir1p und GFP-Yal054cp wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p, Mir1p, Pgk1p bzw. GFP, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. \*markiert eine Überexposition des GFP-Antikörpers.

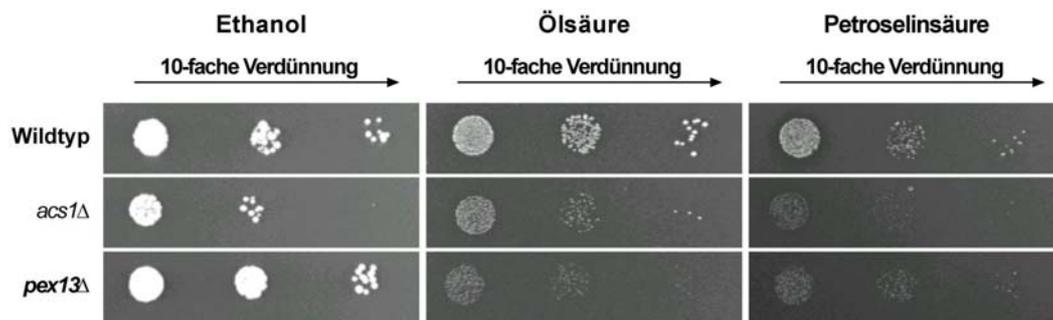
Entsprechend ihrer peroxisomalen Lokalisation konnten die Markerproteine Fox3p, Pex11p und Katalase in Gradientenfraktionen mit einer für Peroxisomen typischen Dichte von 1.200-1.216 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 11-13) nachgewiesen werden, getrennt von Mitochondrien, die bei einer Dichte um 1.181 g/cm<sup>3</sup> (Fraktion 16) vorlagen. Entsprechend einer cytosolischen Lokalisation konnte das GFP-Yal054cp-Fusionsprotein kolokalisiert zu der Pgk1p in den Fraktionen mit einer Dichte von 1,118-1.14 g/cm<sup>3</sup> (Fraktionen 23-29) detektiert werden. Eine

Assoziation zu Peroxisomen konnte erst durch eine Überexposition der ECL-Detektion erreicht werden (Abb. 3.49, \* Markierung), die aber auch bei der Pgk1p, dem cytosolischen Protein, beobachtet werden konnte. Dieses Experiment bestätigte, dass es sich weder um eine peroxisomale noch um eine mitochondriale Lokalisation handelt.

In Abb. 3.52 ist die Detektion des an Lipid-Partikeln und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) vorkommenden Proteins Erg6p (8) in den Fraktionen 11-29 desselben Saccharose-Gradienten gezeigt, wobei verstärkt Acs1p/Yal054cp in den Fraktionen 15-17, die vermutlich auch die Lipid-Partikel enthalten, und in den Fraktionen 23-29, die aufgrund der Antikörper-Detektion Proteine des ER beinhalten, nachgewiesen werden konnte. Das in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtete punktierte Verteilungsmuster widerspricht einer cytosolischen Lokalisation, die ihrerseits durch eine diffuse Protein-Verteilung charakterisiert ist.

### **3.2.11.3 Wachstumsanalyse auf verschiedenen Kohlenstoffquellen**

Zur Analyse einer möglichen Bedeutung der Acs1p/Yal054cp für die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde untersucht, inwieweit die Mutante *acs1Δ* in der Lage ist, den entsprechenden Kohlenstoff zu verwerten. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4742 sowie der entsprechenden *pex13Δ* Mutante untersucht. Letztere diente auch in diesem Experiment als Negativ-Kontrolle. Als Kohlenstoffquellen dienten Ethanol und die ungesättigten Fettsäuren Öl- bzw. Petroselinensäure. Die Untersuchungen erfolgten durch Wachstumsanalysen auf Agarplatten (Abb. 3.50). Auf der Ethanol enthaltende Agarplatte konnte ein zum Wildtyp und zur *pex13Δ* Mutante minimal vermindertes Wachstum der Mutante *acs1Δ* beobachtet werden. Standen Öl- oder Petroselinensäure als alleinige Kohlenstoffquellen zur Verfügung, wurde eine leichte Wachstumsstörung beobachtet. Die *pex13Δ* Mutante zeigte erwartungsgemäß auf beiden fettsäurehaltigen Medien kein Wachstum (Abb. 3.50).



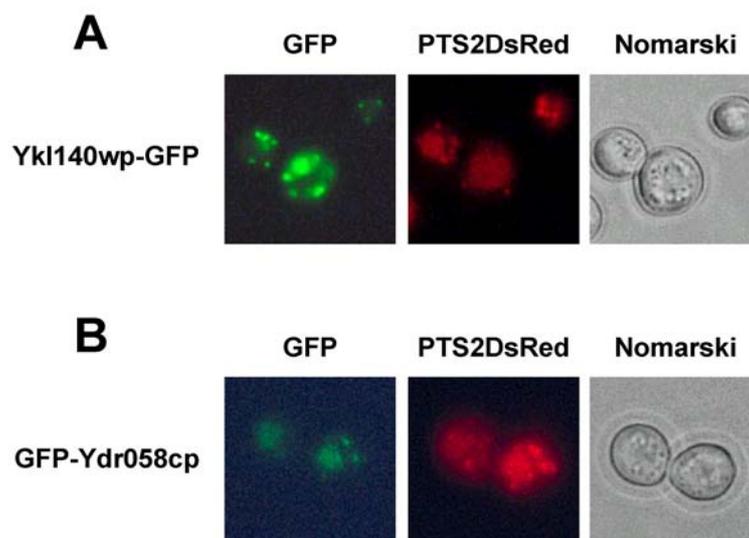
**Abb. 3.50 Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der Mutante *yal054cΔ* (*acs1Δ*) und der Mutante *pex13Δ* anhand von Agarplatten.** Als alleinige Kohlenstoffquelle dienen Ethanol, Ölsäure oder Petroselininsäure. Zur Analyse des Wachstums auf Agarplatten wurden 2 µl einer sukzessiven 10-fach-Verdünnung direkt auf die Platten aufgetragen, die anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Die links aufgetragene Zellmenge entspricht  $2 \times 10^3$  Zellen. Das Wachstum der Zellen ist durch Einzelkolonie- und Hofbildung angezeigt.

### 3.2.12 22 der identifizierten Proteine sind nicht in Peroxisomen lokalisiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 22 weitere Proteine fluoreszenzmikroskopisch und z.T. biochemisch auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht, da diese entweder noch unbekannt war oder eine zusätzliche Assoziation mit Peroxisomen angenommen werden konnte. Zur Untersuchung der Lokalisation in den Zellen von *S. cerevisiae* wurden die Proteine, wie zuvor beschrieben, an ihrem N- oder C-terminalen Ende mit GFP markiert, zusammen mit dem peroxisomalen Marker PTS2DsRed in die Zellen transformiert und nach Induktion der Zellen mit Ölsäure und/oder Ethanol fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

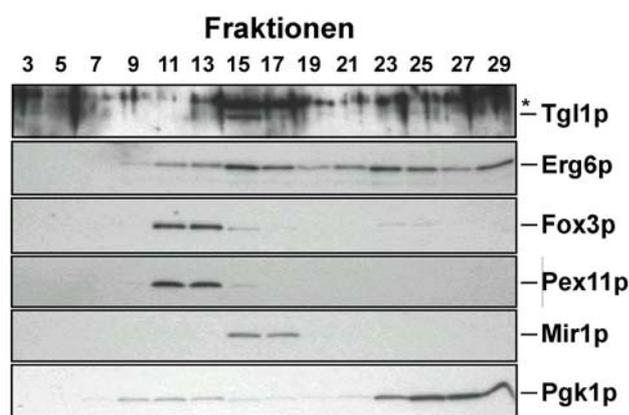
#### 3.2.12.1 Die Triglycerid-Lipasen 1 (YKL140W) und 2 (YDR058C) sind mit Lipid-Partikeln assoziiert, nicht aber mit Peroxisomen.

Triglycerid-Lipasen wurden in Hefe in Lipid-Partikeln detektiert (8). Die Identifizierung zweier Triglycerid-Lipasen (Tgl1p und Tgl2p) in unserem proteomischen Ansatz (Abb. 3.1) ließ eine Verbindung zwischen Lipid-Partikeln und Peroxisomen vermuten. Die Abb. 3.51 zeigt jeweils punktierte Fluoreszenzmuster für die GFP-Fusionskonstrukte von Tgl1p (Ykl140wp) und Tgl2p (Ydr058cp), die nicht mit dem punktierten Muster des roten peroxisomalen Markers PTS2DsRed übereinstimmen. Die peroxisomale Lokalisation des PTS2DsRed wurde bereits gezeigt (219), so dass von einer peroxisomalen Lokalisation der Triglycerid-Lipasen nicht ausgegangen werden konnte.



**Abb. 3.51:** Untersuchungen zur Lokalisation des Ykl140wp-GFP (A), des GFP-YDR058cp (B) und des PTS2DsRed (A+B) in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

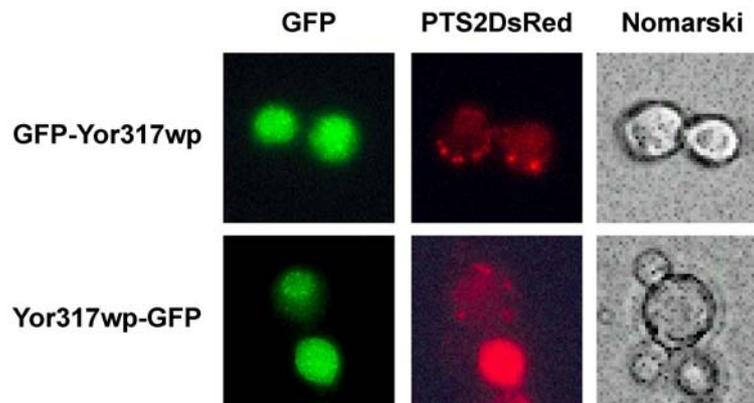
Zusätzlich konnte die subzelluläre Lokalisation der Tgl1p/Ykl140wp mittels subzellulärer Fraktionierung mit einem Saccharose-Dichtegradienten nachgewiesen werden. Die biochemische Analyse dieses Dichtegradienten ist bereits in Abb. 3.49 dargestellt. Abb. 3.52 beschränkt sich deshalb auf die Western-Blot-Detektion. Tgl1p/Ykl140wp wurde in Fraktion 15, bei einer Dichte, die auch der von Mitochondrien entspricht ( $1.186 \text{ g/cm}^3$ ), gefunden, kolokalisiert mit Erg6p, einem in Lipid-Partikeln lokalisiertem Protein (8). Da dieses jedoch zusätzlich im ER angesiedelt ist, konnte es in nahezu allen Fraktionen des Gradienten nachgewiesen werden (Abb. 3.52). Als peroxisomale und mitochondriale Marker dienten auch hier Fox3p, Pex11p bzw. Mir1p. Als zusätzlicher cytosolischer Marker wurde Pgk1p eingesetzt, das hauptsächlich in den Fraktionen des Ladevolumens (23-29) zu finden war.



**Abb. 3.52: Detektion der Tgl1p in Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten.** Ein zellfreies Organellensediment aus Ölsäure-induzierten Zellen der BJ1991-Transformante GFP-Yal054cp (siehe oben) wurde auf einem 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Zur immunologischen Detektion des Tgl1p, Erg6p, Fox3p, Pex11p, Mir1p und Pgk1p wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulosefilter wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Tgl1p, Erg6p, Fox3p, Pex11p, Mir1p und Pgk1p, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. \* markiert Kreuzreaktionen des Antikörpers gegen Tgl1p.

### 3.2.12.2 Cytosolische Proteine: *Faa1p/Ybr317cp*

Das Enzym Faa2p mit einer Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität ist als peroxisomales Protein in der Hefe *S. cerevisiae* bereits bekannt und dient dem Import endogener Fettsäuren (120). Wir identifizierten in unseren Ansätzen zweifach die zu diesem Enzym zu 29% identische Faa1p mit dem offenen Leserahmen YBR317C, die bisher als ausschließlich cytosolisches Enzym charakterisiert wurde (134) und gemeinsam mit der Faa4p an der Aktivierung langkettiger Fettsäuren im Cytosol beteiligt ist (120). Mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen der GFP-Fusionen mit dem C-Terminus oder dem N-Terminus des Proteins konnten die GFP-Fusionsprodukte im Rahmen dieser Arbeit im Cytosol verteilt nachgewiesen werden (Abb.3.53).

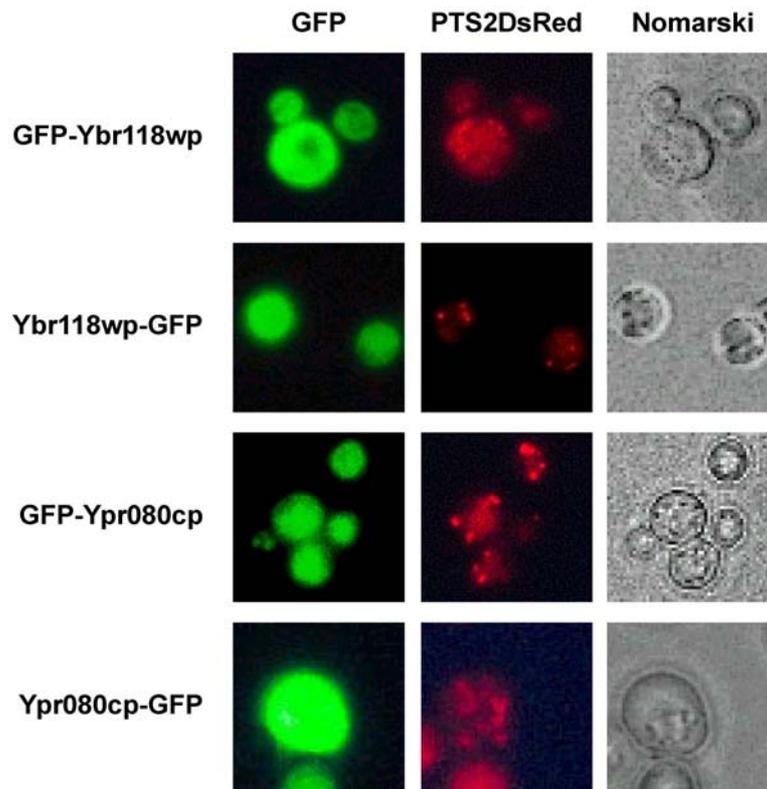


**Abb. 3.53:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Ybr317cp, Ybr317cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

### 3.2.12.3 Sieben cytosolische Proteine

Für sieben weitere Proteine konnte durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen keine peroxisomale, sondern eine cytosolische Lokalisationen festgestellt werden.

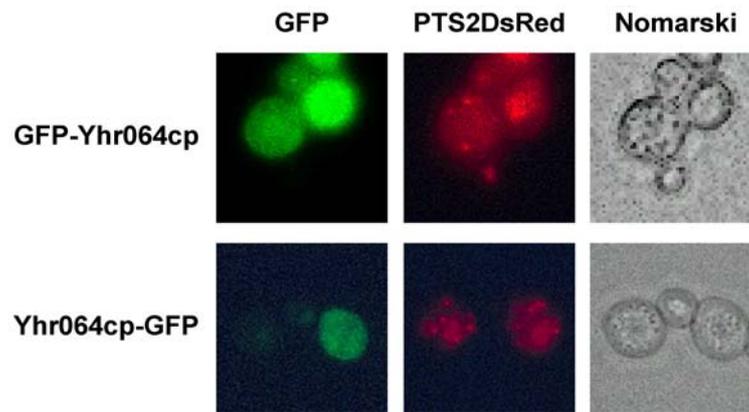
Zu diesen Proteinen gehörte ein unbekanntes Protein, das vom *YAL032C*-Gen kodiert wird und zusammen mit den Triglycerid-Lipasen (Abb. 3.1) aus derselben Proteinbande isoliert und identifiziert wurde. Eine Geranyl-Geranyl-Transferase-Untereinheit (*YJL031C*, *BET4*), die eine Rolle im Lipid-, Fettsäure- und Sterol-Metabolismus spielt, konnte ebenfalls nicht den Peroxisomen zugeordnet werden; genauso wie nur ein diffuses Leuchten bei der jeweiligen GFP-Fusion eines unbekanntes Proteins (*YNR021W*) und eines Proteins (*YKL091C*) mit Ähnlichkeit zu *Sec14p*, das für den Transport sekretorischer Proteine vom Golgi-Apparat benötigt wird, beobachtet werden konnte. Die identifizierte S-Adenosylmethionin Synthetase 2 (*SAM2*, *YDR502C*), deren Lokalisation bislang unklar war, gehört ebenfalls in diese Gruppe der nicht peroxisomal lokalisierten Proteine. Ebenfalls in diese Kategorie gehören die beiden als Translations-Elongations-Faktoren *Tef1p* (*YPR080C*) und *Tef2p* (*YBR118W*) charakterisierten Proteine (Abb. 3.54).



**Abb. 3.54:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Ybr118wp, Ybr118wp-GFP, GFP-Ypr080cp, Ypr080cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

#### Yhr064cp/Pdr13p

Dass Chaperone, wie das Hsp70p und das DnaJ-ähnliche Djp1p, bei beiden Importwegen an der Substraterkennung oder der Zielsteuerung der Substrat-Rezeptor-Komplexe in die peroxisomale Matrix beteiligt sind, konnte bereits mehrfach gezeigt werden (100, 250). Ein im Rahmen dieser Arbeit identifiziertes, zur Hsp70-Familie gehörendes Protein (Pdr13p), dass vom *YHR064C*-Gen kodiert wird, konnte nicht als peroxisomal charakterisiert werden. Auch die Mutante *yhr064cΔ* zeigte auf fettsäure- und ethanolhaltigen Medien ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum (Tab. 3.1), so dass eine direkte Verbindung zu Peroxisomen mittels dieser Experimente nicht gezeigt werden konnte.

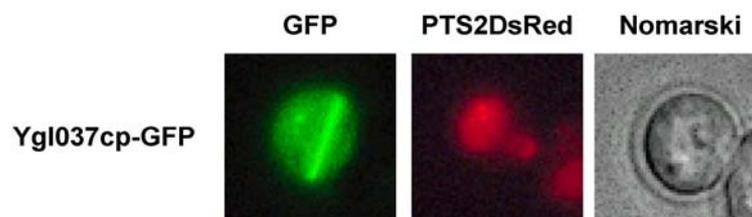


**Abb. 3.55:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yhr064cp, Yhr064cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

### 3.2.12.4 Sonstige subzelluläre Lokalisationen

#### Ygl037cp

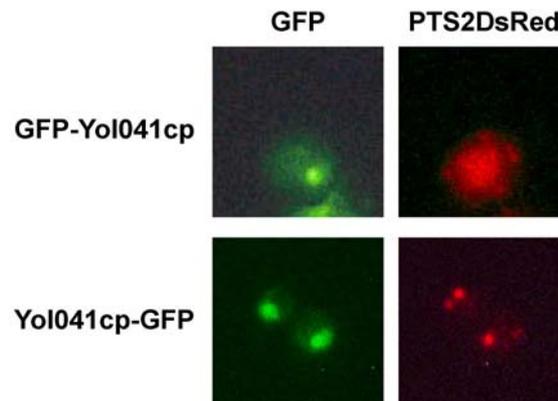
Eine interessante Beobachtung konnte in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse für ein bislang unbekanntes Protein gemacht werden, das vom *YGL037C*-Gen kodiert wird. Die GFP-Fusion mit dem Protein zeigte eine stäbchenförmige Struktur in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.56). Dieser „Stab“ durchspannte die gesamte Zelle, wie man es bei fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli und Actinfilamenten beobachten konnte. Studien belegten, dass sich Peroxisomen sowohl in Hefe- als auch in Pflanzenzellen entlang von Actinfilamenten und nicht von Mikrotubuli bewegen (109, 156). Eine Kolo­kalisierung der stabförmigen Struktur mit dem peroxisomalen Marker wurde nicht festgestellt, wobei es sich deshalb bei dem unbekannt­en Protein Ygl037cp eher um Mikrotubuli-assoziiertes Protein handeln könnte.



**Abb. 3.56:** Untersuchungen zur Lokalisation des Ygl037cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigen Medien.

## Yol041cp/Nop12p

Die in dieser Studie gewonnenen fluoreszenzmikroskopischen Daten für Nop12p (YOL041C) scheinen mit der in der Zwischenzeit erschienenen publizierten Lokalisation im Nukleolus (264) überein zustimmen, so dass auf eine weitere Untersuchung der Proteine verzichtet wurde.

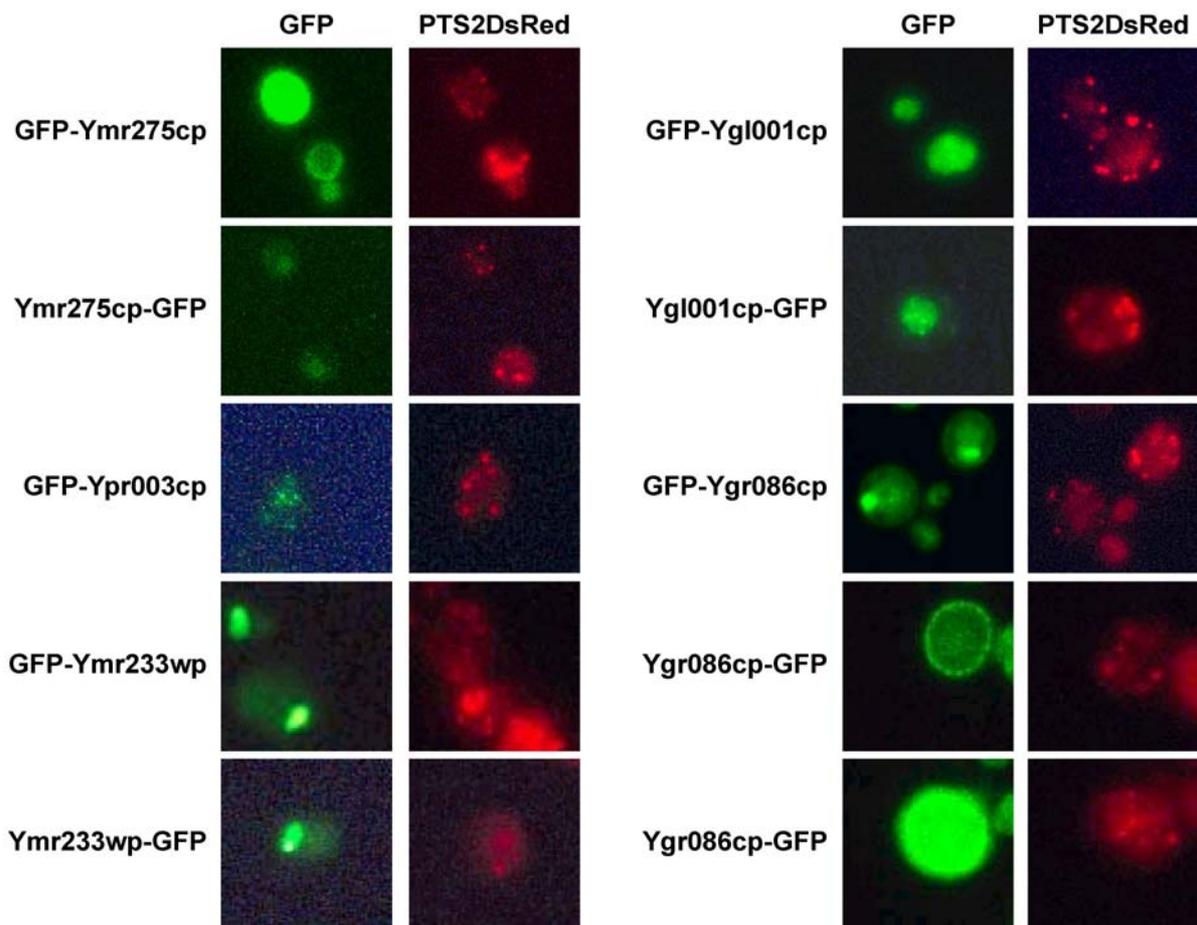


**Abb. 3.57:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yol041cp, des Yol041-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

### 3.2.12.5 Fünf Proteine mit unbestimmter Lokalisation

Bei fünf identifizierten Proteinen konnte eine peroxisomale, mitochondriale oder cytosolische Lokalisation nach Betrachtung der GFP-Fusionsprodukte mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgeschlossen werden. In Abb. 3.58 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der folgenden Proteine dargestellt.

Dazu gehört das Bul1p (YMR275c), das bei der Ubiquitinierung von Proteinen eine Rolle spielt; ein potentieller Membrantransporter, Ypr003cp; ein Protein, dessen zelluläre Rolle unbekannt ist (YMR233W) und eine C-3 Sterol-Dehydrogenase (YGL001C, ERG26), deren Fluoreszenzmuster auf eine vakuoläre Lokalisation deutet, aber nicht belegt wurde. Ein weiteres unbekanntes Protein (YGR086C) zeigte je nach Kopplung mit GFP ein unterschiedliches Fluoreszenzmuster: bei der Betrachtung des N-terminalen Fusionskonstruktes (GFP-Ygr086cp) wurde ein einzelner leuchtender Fleck in der Zelle beobachtet. Die C-terminale Fusion zeigte entweder ein cytosolisches Leuchten über die gesamte Zelle verteilt oder eine verstärkte ringförmige Fluoreszenz, die vielleicht von der Plasmamembran herrührt.



**Abb. 3.58:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Ymr275cp, Ymr275cp-GFP, GFP-Ypr003cp, GFP-Ymr233wp, Ymr233wp-GFP, GFP-Ygl001cp, Ygl001cp-GFP, GFP-Ygr086cp, Ygr086cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Stammes BJ1991. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

#### Ydi077cp/Vam6p

Eine besondere Rolle spielte das identifizierte Protein Vam6p (Ydi077cp), das an der Vakuolenbildung beteiligt ist (171). Weder eine diffuse noch eine punktierte Fluoreszenz konnte bei diesen GFP-Fusionskonstrukten beobachtet werden, so dass aufgrund dieser Experimente keine Zuordnung zu einem Organell oder dem Cytosol erfolgen konnte. Für dessen Mutante wurden generelle Wachstumsdefizite sowohl auf Glukose- als auch auf fettsäure- und ethanolhaltigem Medium festgestellt, obwohl jene nicht letal ist (Tab. 3.1).

#### Wachstumsanalysen der Mutanten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zur Analyse einer potentiellen Bedeutung der Proteine des Kapitels 3.2.12 für den peroxisomalen Stoffwechsel wurden die zu den GFP-markierten Proteinen gehörenden Deletionsmutanten ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, auf Ethanol, Ölsäure oder Petroselinensäure als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen zu können. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: Wachstumsverhalten der Mutanten auf Glukose, Ethanol, Ölsäure und Petroselin-säure.

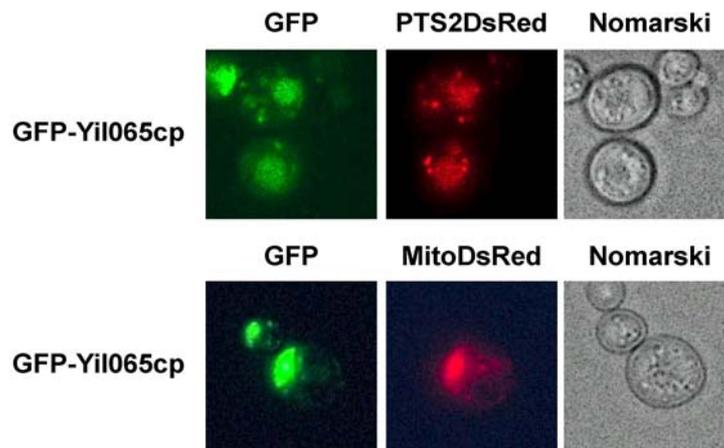
Gen	ORF	Glukose	Ethanol	Ölsäure	Petroselin-säure	Anmerkung
-	YGL037C	+	+	+	+	-
<i>NOP12</i>	YOL041C	+		+	+	-
<i>BUL1</i>	YMR275C	+	+	+	+	-
-	YKL091C	+	+	+	+	-
-	YPR003C	+	+	+	+	-
-	YMR233W	+	+	+	+	-
-	YGR086C	+	+	+	+	-
<i>SAM2</i>	YDR502C	+	+	+	+	-
<i>PDR13</i>	YHR064C	+	+	+	+	-
-	YGL121C	+	+	+	+	-
-	YCL056C	+	+	+	+	-
<i>TGL1</i>	YKL140W	+	+	+	+	-
<i>TGL2</i>	YDR058C	+	+	+	+	-
<i>FAA1</i>	YBR317C	+	+	+	+	-
<i>FUN20</i>	YAL032C	nd	nd	nd	nd	letal
<i>BET4</i>	YJL031C	nd	nd	nd	nd	letal
-	YNR021W	+	+	+	+	-
<i>TEF1</i>	YPR080C	nd	nd	nd	nd	nd
<i>TEF2</i>	YBR118W	nd	nd	nd	nd	nd
<i>ERG26</i>	YGL001C	nd	nd	nd	nd	letal
<i>VAM6</i>	YDL077C	-	-	-	-	genereller Wachstumsdefekt

Ergebnisse der Wachstumstests auf ethanol-, ölsäure- oder petroselin-säurehaltigen Medien. Wachstum ist mit + gekennzeichnet, ein Wachstumsdefekt mit -. nd bedeutet, dass keine Daten gewonnen werden konnten ("not determined"), da die Mutante entweder letal ist oder da keine haploide Mutante zur Verfügung stand.

### 3.2.13 Pmp15p, Pmp17p und Pmp18p

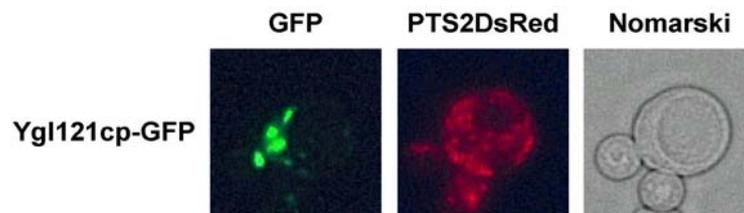
Zusätzlich zu den mittels massenspektrometrischer Methoden identifizierten Proteinen, erfolgte im Rahmen des reversen genetischen Ansatzes die Isolierung von drei Proteinen mit Molekulargewichten von 15 kDa, 17 kDa und 18 kDa, deren Sequenzen mittels Peptidsequenzierungen (R. Erdmann, persönliche Mitteilung) identifiziert wurden. Aufgrund ihrer Molekulargewichte und der Isolierung aus hochsalzresistenten Proteinen (Abb. 3.1) wurden die Proteine als Pmp15p, Pmp17p und Pmp18p bezeichnet. Die Sequenzierung der drei Proteine im Rahmen des Hefe-Genom-Projekts (offene Leserahmen Pmp15p-Ygl121cp, Pmp17p-Ycl056cp, Pmp18p-Yil065cp) ermöglichte deren Identifizierung.

Das mittlerweile als Fis1p (Yil065cp) identifizierte Pmp18p-Protein konnte in der Mitochondrienmembran lokalisiert werden (168). Die in dieser Studie gewonnenen fluoreszenzmikroskopischen Daten bestätigten die publizierten Ergebnisse. Eine zusätzliche peroxisomale Lokalisation konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.59).



**Abb. 3.59:** Untersuchungen zur Lokalisation des GFP-Yil065cp, des PTS2DsRed und des MitoDsRed in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäure- bzw. ethanolhaltigem Medium.

Dagegen bleibt die subzelluläre Lokalisation der beiden potentiellen peroxisomalen Membranproteine Pmp17p/Ycl056cp (Daten nicht gezeigt) und Pmp15p/Ygl121cp noch ungeklärt. Das GFP-Fusionsprodukt mit Ygl121cp zeigte zwar ein punktiertes Verteilungsmuster, welches aber nicht mit dem des peroxisomalen Markers übereinstimmte (Abb. 3.60). Eine mitochondriale Lokalisation konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Eine subzelluläre Zuordnung konnte aus den so gewonnenen Daten nicht erfolgen.



**Abb. 3.60:** Untersuchungen zur Lokalisation des Ygl121cp-GFP und des PTS2DsRed in Zellen des Stammes BJ1991 mit Hilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie. Die Induktion der Zellen erfolgte für mind. 24 Std. auf ölsäurehaltigem Medium.

### 3.2.14 Überblick

Die in dieser Arbeit analysierten Proteine sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2: Identifizierte und lokalisierte Proteine des reversen genetischen Ansatzes**

Protein Name	ORF	GEN	Lokalisation [Potentiell]	Referenz
Enoyl-CoA-Isomerase	<u>YLR284C</u>	<u>ECI1</u>	Peroxisomal	(78), d. A.
Dienoyl-CoA-Isomerase	<u>YOR180c</u>	<u>DCI1</u>	Peroxisomal	(77), d. A.
Thioesterase	<u>YJR019C</u>	<u>TES1</u>	Peroxisomal	(124), d. A.
Protein unbekannter Funktion	<u>YOR084W*</u>	-*	[Peroxisomal]	(125), d. A.
Protein mit Ähnlichkeit zu einer Oxalyl-CoA Decarboxylase	<u>YEL020C*</u>	-*	[Peroxisomal]	(69), d. A.
Saccharopin-Dehydrogenase 1 [NAD <sup>+</sup> , L-Lysin bildend]	<u>YIR034C</u>	<u>LYS1</u>	Peroxisomal	(79), d. A.
Protein mit starker Ähnlichkeit zu einer Cystationin β-Lyase	<u>YGL184C</u>	<u>STR3</u>	Peroxisomal	(79), d. A.
Acetyl-CoA Hydrolase 1	<u>YBL015W</u>	<u>ACH1</u>	[Peroxisomal, Mitochondrial]	(48), d. A.
Acetyl-CoA Synthetase 1	<u>YAL054C</u>	<u>ACS1</u>	[Peroxisomal und Mitochondrial]	(125), (41)
Potentielle Serin/Threonin Protein Kinase	<u>YCR091W</u>	<u>KIN82</u>	[Peroxisomal und Mitochondrial]	d. A.
Succinat-Fumarat-Transporter	<u>YJR095w</u>	<u>SFC1</u>	Mitochondriale Membran	(183)
Protein mit Ähnlichkeit zu YHR198	<u>YHR199C</u>	-	[Mitochondrial]	d. A.
Protein unbekannter Funktion	<u>YOR228C</u>	-	[Mitochondrial]	d. A.
Protein in mitochondriale Teilung involviert	<u>YIL065C</u>	<u>FIS1</u>	Mitochondrial	(168)
Putativer Sulfat-Transporter	<u>YPR003c</u>	-	[unspezifische Membran]	(186), d. A.
Protein unbekannter Funktion	<u>YGR086C</u>	-	[Plasma-Membran]	d. A.
Protein mit Ähnlichkeit zu Sec14p	<u>YKL091C</u>	-	[Cytosolisch]	d. A.
Vakuolen-bildendes Protein	<u>YDL077c</u>	<u>VAM6</u>	Vakuoläre Membran, n.d.	(171), d. A.
Putative β-Hydroxy-Steroid Dehydrogenase/Δ5→4-Isomerase	<u>YGL001C</u>	<u>ERG26</u>	[Vakuolär]	d. A.
Protein unbekannter Funktion	<u>YNR021W</u>	-	Membran, [Cytosolisch]	d. A.
Triglycerid-Lipase I	<u>YKL140W</u>	<u>TGL1</u>	[Lipid-Partikel]	(8), d. A.
Triglycerid-Lipase II	<u>YDR058C</u>	<u>TGL2</u>	Lipid-Partikel	(240), d. A.
Protein zum prä-mRNA-Splicing	<u>YAL032C</u>	<u>FUN20</u>	[Nuklear], Cytosolisch	d. A.
Protein zur Synthese von 25S prä-rRNA	<u>YOL041C</u>	<u>NOP12</u>	Nuklear	(264), d. A.
Protein mit unbekannter Funktion	<u>YMR233W</u>	-	[Nuklear]	d. A.
Long-Chain-Fatty-Acid-CoA-Ligase 1	<u>YOR317W</u>	<u>FAA1</u>	Cytosolisch	(120), d. A.
Translations-Elongation Faktor 1/2-α	<u>YPR080W</u> <u>YBR118W*</u>	<u>TEF1/2*</u>	Cytosolisch, Ribosomen-assoziiert	(76), d. A.
Geranyl-Geranyl-Transferase α-Untereinheit	<u>YJL031C</u>	<u>BET4</u>	Cytosolisch	(263), d. A.
Protein des Ubiquitinierungswegs	<u>YMR275C</u>	<u>BUL1</u>	[Cytosolisch]	d. A.
S-Adenosyl-Methionin Synthetase 2	<u>YDR502C</u>	<u>SAM2</u>	[Cytosolisch]	d. A.
Mitglied der Hsp70-Familie	<u>YHR064C</u>	<u>PDR13</u>	[Cytosolisch]	d. A.
Pyrazinamidase	<u>YGL037C</u>	<u>PNC1</u>	[Mikrotubuli-assoziiert]	d. A.
Protein unbekannter Funktion	<u>YGL121C</u>	-	n.d.	d. A.
Protein unbekannter Funktion	<u>YCL065C</u>	-	n.d.	d. A.

Die mit \* markierten Gene und ORF wurden in beiden Ansätzen zur Identifizierung peroxisomaler Proteine detektiert. Unterstrichen markiert sind die in dieser Arbeit gefundenen, neuen peroxisomalen und/oder mitochondrialen Proteine. d.A. (diese Arbeit) bedeutet, dass die gewonnenen Daten aus dieser Arbeit hervorgehen, n.d. (nicht detektiert) bedeutet, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Lokalisation bestimmt werden konnte.

### 3.3 Untersuchungen zu Pex11p

Das Peroxin Pex11p spielt bei der Proliferation und anschließenden Teilung von Peroxisomen eine direkte Rolle. Eine Deletion des *PEX11*-Gens führt zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Peroxisomen, wohingegen eine Überexpression von *PEX11* zu einer Zunahme an kleinen Peroxisomen führt (59, 88, 154, 203). Weitere Studien belegten, dass der Verlust des *PEX11* die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation von mittellangen Fettsäuren verhindert (243).

Eine neue potentielle Funktion des *S. cerevisiae* Pex11p als porenformendes Protein in der Membran von Peroxisomen wurde aufgrund von Sequenzvergleichen und Homologie-Analysen peroxisomaler Porine in Pflanzen mit *ScPEX11* angenommen (persönliche Mitteilung S. Reumann). Bisher wurden Porine in Membranen von Bakterien (13), Mitochondrien (als spannungsabhängige Kanäle, "voltage-dependent anion-selective channel", Por1p und Por2p; (34)), Plastiden (66, 67, 187) und auch von pflanzlichen Peroxisomen (198) nachgewiesen. In Hefezellen wurde bislang allerdings noch kein Protein gefunden, das einen Kanal in der Membran von Peroxisomen bildet. So bleibt eine zentrale Frage im peroxisomalen Metabolismus bestehen, ob Metaboliten mit einer geringen molekularen Masse mittels spezifischer Translokatoren oder durch porenformende Proteine die peroxisomale Membran passieren (zur Übersicht: (197)).

#### 3.3.1 Erstellung und Überprüfung von Gendelektionsmutanten der *PORIN*-Gene 1 und 2 und des *PEX11*

Da die beiden spannungsgesteuerten kanalbildenden Proteine Por1p und Por2p als dominante Proteine in mitochondrialen Membranen von *S. cerevisiae* (34) auftreten und eine Kontamination mit diesen mitochondrialen Porinen bei der Aufreinigung von Peroxisomen aus Zellen von *S. cerevisiae* nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Deletionsmutanten dieser Porine erstellt und anschließend Peroxisomen und Mitochondrien mittels subzellulärer Fraktionierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation getrennt, um mit ausschließlich peroxisomalen Proteinen später elektrophysiologische Experimente durchführen zu können.

Zunächst wurde eine *POR2*-Gendelektionsmutante erstellt, bei der der offene Leserahmen des *POR2* durch das *KanMX*-Modul ersetzt wurde. Mittels präparativer PCR-Reaktion wurde ein PCR-Fragment hergestellt, das sich aus der loxP-*KanMX*-loxP-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des *POR2*-Gens zusammensetzte. Nach der Transformation des DNA-Fragments in den Protease-defizienten Stamm BJ1991 erfolgte mittels homologer Rekombination eine Integration des *KanMX*-Moduls an die genomische

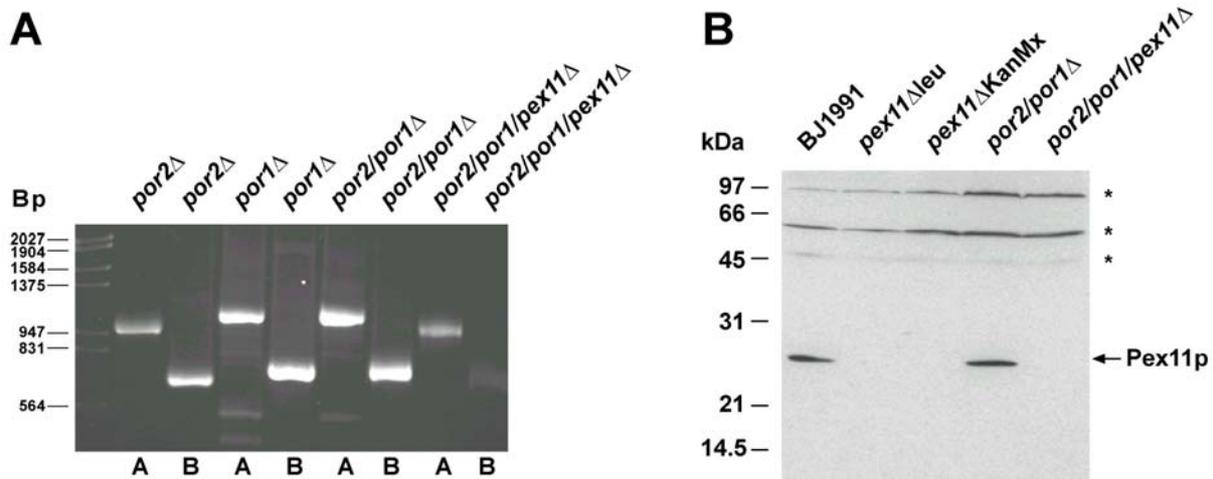
Stelle des *POR2*-Gens. Resultierende Geneticin<sup>®</sup>-resistente Klone wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion auf die korrekte Integration der KanMX-Kassette in den *POR2*-Lokus überprüft. Hierzu wurde genomische DNA aus potentiellen *POR2*-Gendeletionsklonen und aus dem Wildtyp BJ1991 isoliert. Unter Verwendung der Oligonukleotid-Kombinationen RE 132/215 und RE 133/216 wurden aus isolierter genomischer DNA von *POR2*-Mutanten mittels analytischer PCR Teile des *KanMX*-Moduls sowie der 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des *POR2*-Gens amplifiziert. Erwartungsgemäß erfolgte aus genomischer DNA des Wildtyps keine DNA-Amplifikation (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung genomischer DNA aus potentiellen *POR2*-Deletionsklonen führte zu den erwarteten Amplifikationsprodukten der Größe 980 Bp und 670 Bp (Abb. 3.61A). Die PCR-Reaktionen bestätigten somit die Substitution des *POR2*-Gens durch das KanMX-Modul. Dieser überprüfte Gendeletionsklon wird im Folgenden als *por2Δ*-Mutante bezeichnet.

Dieselbe Strategie wurde auch zur Erstellung einer *pex11Δ*-Mutante (*pex11ΔKanMx*) verfolgt. Nach präparativer PCR-Reaktion und Transformation des DNA-Fragments in den Stamm BJ1991 erfolgte die Überprüfung der korrekten Integration der KanMX-Kassette in den *PEX11*-Lokus mittels analytischer PCR unter Verwendung der Oligonukleotid-Kombinationen RE132/296 und RE133/297.

Zur Herstellung der Doppelmutante *por2/por1Δ* wurde das *KanMX*-Modul durch Expression des loxP-spezifischen Exzisionsproteins wieder aus der *por2Δ*-Mutante entfernt und nach präparativer PCR konnte auch der größte Teil des *POR1*-Gens (Bp 49-849) durch die loxP-KanMX-loxP-Sequenz ersetzt werden. Der resultierende Gendeletionsklon wird nachfolgend als *por2/por1Δ*-Mutante bezeichnet.

Um für die elektrophysiologischen Messungen eine „Null-Kontrolle“ zur Verfügung zu haben, wurde in einem weiteren Schritt aus dieser Doppelmutante schließlich auch noch das *PEX11*-Gen entfernt, wozu wiederum das zu deletierende Gen durch das KanMX-Modul ausgetauscht werden konnte. Die erhaltene und überprüfte Dreifach-Mutante wird im Folgenden *por2/por1/pex11Δ*-Mutante genannt.

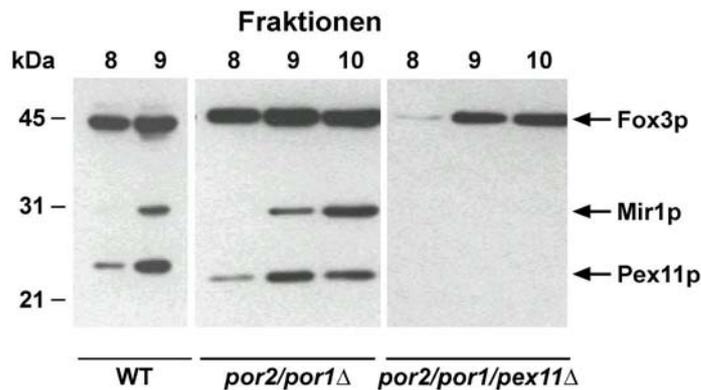
Mittels des zur Verfügung stehenden Pex11p-Antikörpers konnten die *PEX11*-defizienten Mutanten zusätzlich immunologisch überprüft werden. Dazu wurden zunächst Ölsäure-induzierte Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 und der Mutanten *pex11Δ (leu)*, *pex11Δ (KanMx)*, *por2/por1Δ* und *por2/por1/pex11Δ* nach der Methode von Yaffe und Schatz (266) aufgeschlossen, Gesamtzell-Lysate gewonnen, Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Transfer auf Nitrocellulose-Membranen mit Pex11p-Antiserum inkubiert (Abb. 3.61B).



**Abb. 3.61:** Überprüfung der Deletionsmutanten *por2Δ*, *por1Δ*, *por2/por1Δ* und *por2/por1/pex11Δ* mittels analytischer PCR (A) und immunologische Detektion des Pex11p in Gesamtzell-Lysaten des WT BJ1991 und der Deletionsmutanten *pex11Δ*, *por2/por1Δ* und *por2/por1/pex11Δ* (B). (A) Bei korrekter Insertion des KanMX-Moduls in den jeweiligen Gen-Lokus waren unter Verwendung der Oligonukleotidkombinationen RE132/215 und RE133/216 (für *por2Δ*), RE 132/211 und RE 133/212 (für *por1Δ* und *por2/por1Δ*), RE132/296 und RE133/297 (für *por2/por1/pex11Δ*) DNA-Fragmente mit einer Länge von 950 Bp (Spuren A) bzw. 650 Bp (Spuren B) zu erwarten. Gezeigt ist ein 0,8%-iges Agarose-Gel von jeweils 1/2 Volumen jedes PCR-Ansatzes. Als Vorlage für die PCR-Reaktion diente genomische DNA der potentiellen Mutanten. (B) Gesamtzell-Lysate des WT BJ1991 und der Mutanten *pex11Δ*, *por2/por1Δ* und *por2/por1/pex11Δ* wurden nach Yaffe und Schatz (266) erzeugt. Gleiche Volumenanteile (1/30 jedes Ansatzes) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE getrennt und auf Membranen aus Nitrocellulose immobilisiert. Die Membran wurde mit Antiserum gegen Pex11p inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. \* zeigen Kreuzreaktionen des Antiserums gegen Pex11p.

### 3.3.2 Subzelluläre Lokalisation

Gewonnene zellfreie Organellensedimente von Ölsäure-induzierten Zellen des Wildtyps BJ1991 und der Mutanten *por2/por1Δ* und *por2/por1/pex11Δ* wurden auf kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Die Detektion der peroxisomalen Proteine Fox3p und Pex11p sowie des mitochondrialen Mir1p in den erhaltenen Fraktionen erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. In Abb. 3.62 sind nur die Fraktionen aus den Saccharose-Gradienten von Wildtyp und Mutanten gezeigt, welche die peroxisomalen und/oder mitochondrialen Proteine enthalten. Um Peroxisomen-spezifische spannungsgesteuerte Kanäle in der Membran messen zu können, war es wichtig, nur die Fraktionen zu verwenden, die peroxisomale Proteine in ausreichendem Maße, aber keine mitochondrialen Proteine mehr enthielten. Von den hier gezeigten Fraktionen verschiedener Saccharose-Gradienten wurden die Fraktion 8 des Wildtyps, die beiden Fraktionen 8 zweier unterschiedlicher Gradienten der Mutante *por2/por1Δ* und die Fraktionen 9 und 10 der Dreifachmutante *por2/por1/pex11Δ* für die Messungen an Lipid-Bilayern ausgewählt.



**Abb. 3.62: Detektion peroxisomaler und mitochondrialer Proteine in Fraktionen von Saccharose-Dichtegradienten.** Organellensedimente zellfreier Lysate aus Ölsäure-induzierten Zellen des Wildtyp-Stammes BJ1991 und der Mutanten *por2/por1*Δ und *por2/por1/pex11p*Δ wurden auf 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Fox3p und Pex11p und des mitochondrialen Proteins Mir1p analysiert. Zur immunologischen Detektion des Fox3p, Pex11p und Mir1p wurden gleiche Volumenanteile (5%) der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Die Nitrocellulosefilter wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Fox3p, Pex11p und Mir1p, inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. Gezeigt sind nur die Fraktionen 8, 9 bzw. 10 aus drei verschiedenen Gradienten.

### 3.3.3 Elektrophysiologische Messungen an künstlichen Membranen

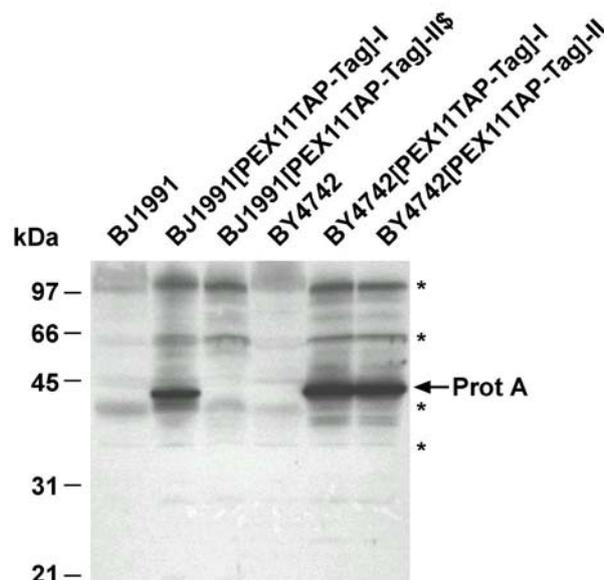
Unter Anleitung von S. Reumann wurden Messungen an künstlichen Membranen (sog. "Lipid-Bilayern" oder "Black-Membranes") an Apparaturen der AG von Prof. Dr. R. Benz am Theodor-Boverie-Zentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Dazu wurden zunächst Lipiddoppelschichten hergestellt, die in der Lage sind, Kompartimente zu bilden, d.h. zwei wässrige Phasen voneinander zu trennen. Man kann mit ihnen so die Matrix biologischer Membranen nachahmen. Die angewandte Methode erlaubt, eine künstliche Membran herzustellen, mit der die Eigenschaften von Porinen untersucht werden können.

Lösungen peroxisomaler Proteine aus den für geeignet gehaltenen Gradienten-Fraktionen (siehe oben) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mittels dieser Lipidmembranen auf den Einbau von Membranproteinen untersucht, um Pex11p schließlich als Porin zu identifizieren. Die große Menge an unterschiedlichen Proteinen sowohl in den Fraktionen der Mutanten als auch des Wildtyps verhinderte jedoch eine klare Darstellung einzelner Kanäle (Daten nicht gezeigt), so dass eine Schlussfolgerung, dass es sich bei Pex11p tatsächlich um eine Porin handelt, nicht getroffen werden konnte.

Um die Funktion des Pex11p als Kanal nachweisen zu können, muss das funktionelle Protein isoliert werden. Da das in *E. coli* heterolog exprimierte *PEX11* zur Bildung von sog. "inclusion-bodies" neigt, wurde eine neue Methode zur Reinigung und Isolierung des nativen Proteins in der Hefe herangezogen und eine Markierung mit dem TAP-Tag (tandem affinity purification-tag; Seraphin, EMBL, Heidelberg) vorgenommen.

### 3.3.4 Erstellung und Überprüfung des TAP-Tags an *PEX11*

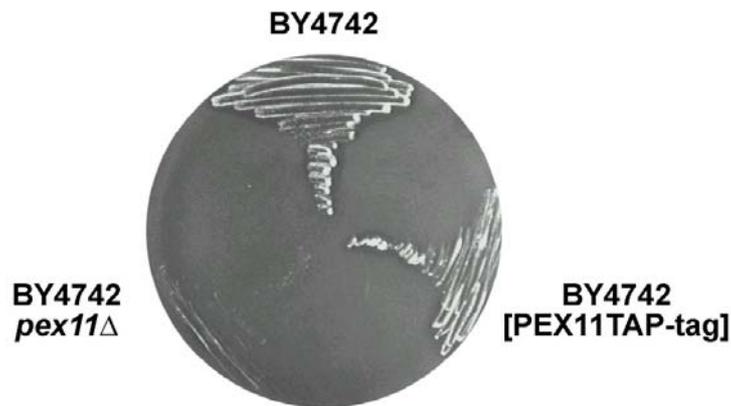
Zur Reinigung und Isolierung des nativen Pex11p aus der Hefe *S. cerevisiae* wurde dieser TAP-Tag an den C-Terminus des *ScPEX11*-Gens gekoppelt (Abb. 2.4). Mittels präparativer PCR wurde ein DNA-Fragment, bestehend aus *PEX11*-Sequenz-Abschnitten und der TAP-Tag-Kassette, unter Verwendung der Oligonukleotide RE 443 und RE 444 hergestellt. Die Integration dieses DNA-Fragments mittels homologer Rekombination in das *S. cerevisiae* Genom der Wildtyp-Stämme BJ1991 und BY4742 bindet den TAP-Tag an das 3'-Ende des *PEX11*-Gens. Unter Verwendung der Oligonukleotid-Kombination RE 175/188 wurde aus isolierter genomischer DNA von potentiellen positiven Klonen mittels analytischer PCR das mit dem TAP-Tags gekoppelte *PEX11*-Gen amplifiziert. Erwartungsgemäß erfolgte aus genomischer DNA der Wildtypen keine DNA-Amplifikation. Die Verwendung genomischer DNA aus potentiellen Tag-Klonen führte zu den erwarteten Amplifikationsprodukten der Größe 950 Bp (Daten nicht gezeigt). Die Expression des Protein A wurde mittels Immunoblot-Analyse überprüft. Dazu wurden zunächst ölsäureinduzierte Zellen der Wildtyp-Stämme BJ1991 und BY4742 und von jeweils zwei Transformanten nach der Methode von Yaffe und Schatz (266) aufgeschlossen. Protein A konnte im überprüften Klon I des BJ1991- und in den beiden Klonen I und II des BY4742-Stammes immunologisch detektiert werden, so dass in diesen drei Transformanten von einer ausreichenden Expression des *PEX11*-TAP-tags ausgegangen wurde (Abb. 3.63).



**Abb. 3.63: Immunologische Detektion des Prot A in Gesamtzell-Lysaten.** Gesamtzell-Lysate des WT BJ1991 und BY4742 und der *PEX11*-TAP-Tag-Transformanten beider Stämme wurden nach Yaffe und Schatz (266) erzeugt. Gleiche Volumenanteile (1/30 jedes Ansatzes) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE getrennt und auf einer Membran aus Nitrocellulose immobilisiert. Die Membran wurde mit einem Antiserum gegen Prot A inkubiert und Immunkomplexe anschließend unter Verwendung des ECL-Systems detektiert. \$ kennzeichnet den nicht exprimierten TAP-Tag.\* markiert Kreuzreaktionen des Antikörpers gegen Prot A und Proteinbanden, die auf Degradation zurückzuführen sind.

### 3.3.4.1 Der PEX11-TAP-Tag ist funktionell

Einen zusätzlichen Hinweis auf die Funktionalität des PEX11-TAP-Tags gibt die Wachstumsanalyse des Wildtyps BY4742, der entsprechenden *pex11* $\Delta$ -Mutante und der Transformante PEX11-TAP-Tag auf Laurinsäure, einer mittellangen Fettsäure (C 12:0), auf der zwar der Wildtyp BY4742, nicht aber die Mutante *pex11* $\Delta$  wachsen kann (243). Die Komplementation des PEX11-TAP-Tags konnte aufgrund des beobachteten Wachstums, das mit dem Wildtyp vergleichbar ist, nachgewiesen werden (Abb. 3.64).



**Abb. 3.64: Funktionalitätstest des PEX11-TAP-Tags durch Wachstum auf Laurinsäure-Medium im Ausstrichverfahren.** Zellen eines BY4742-Wildtyp-Stammes, der entsprechenden *pex11* $\Delta$ -Mutante und der Transformante BY4742[PEX11TAPTag] wurden nach Anzucht auf 0,3%-Glukose-Medium auf einer Agarplatte ausgestrichen, deren Medium als alleinige Kohlenstoffquelle Laurinsäure (C 12:0) enthält. Die Platte wurde für 8 Tage bei 30°C inkubiert. Die Funktionalität des Fusionsproteins kann durch das Wachstum angenommen werden. Die entsprechende Mutante weist den zu erwartenden Wachstumsdefekt auf dieser Fettsäure auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten rekombinanten Hefe-Zellen, die den PEX11-TAP-Tag exprimieren, bilden den Ausgangspunkt für die Reinigung, Isolierung und anschließende funktionelle Analyse des nativen Pex11p. Das in Abb. 3.65 gezeigte Schema gibt den Ablauf beginnend mit der Fusion des Gens mit dem zweifachen Tag bis zur Identifizierung bzw. funktionellen Analyse wieder.

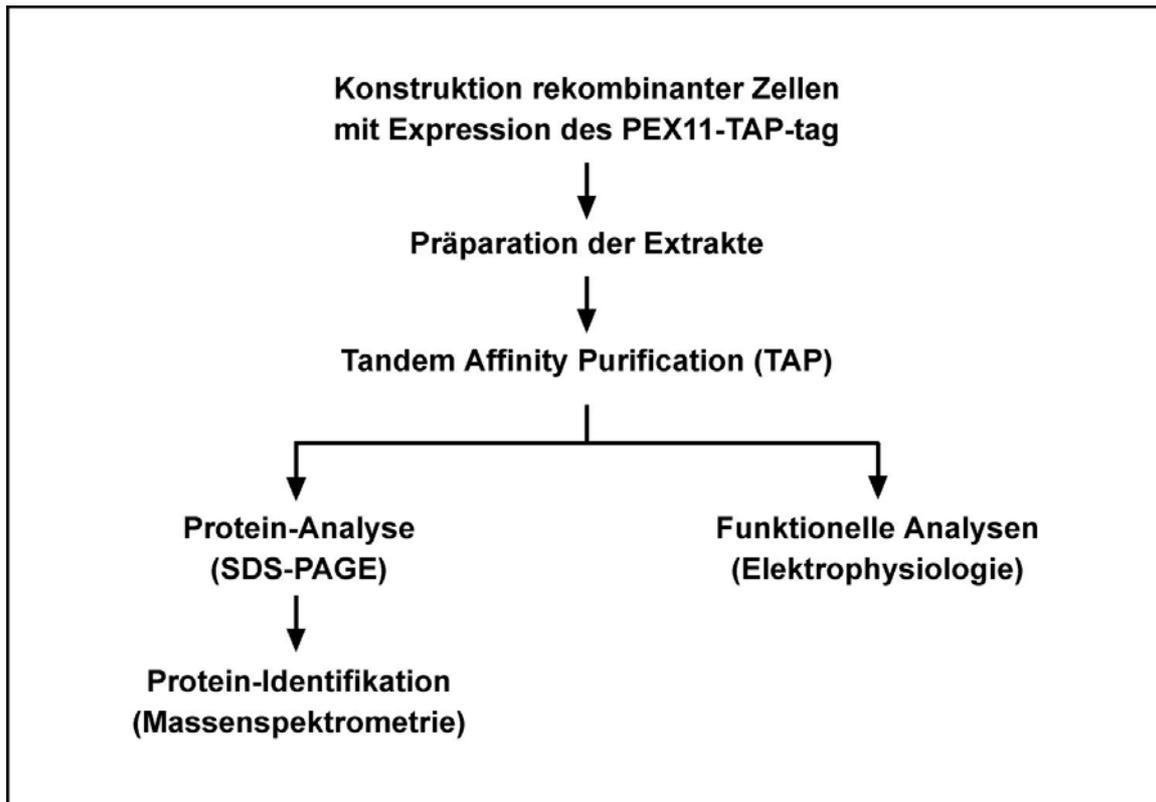


Abb. 3.65: Schematische Darstellung der Analyse TAP-Tag markierter Gene.