

4 Diskussion

In den letzten Jahren konnten durch die Identifizierung und Charakterisierung neuer peroxisomaler Proteine zahlreiche Erkenntnisse gewonnen werden, die das Verständnis der Funktion und Biogenese der Peroxisomen erweiterten. Bislang wurden 24 Peroxine, die für die Biogenese der Peroxisomen essentiell sind (Tab. 1.1), und zahlreiche Proteine der peroxisomalen β -Oxidation identifiziert. Die Peroxine wurden in ihrer Funktion zum einen als Komponenten des Proteinimportes und zum anderen als Komponenten der Membranbiogenese eingeteilt. Obwohl eine Reihe peroxisomaler Proteine identifiziert wurde und auch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen gefunden wurden, reichen die bisherigen Kenntnisse noch nicht aus, die Biogenese von Peroxisomen und deren Stoffwechselfunktionen vollständig zu verstehen. Deshalb ist die Identifizierung und Funktionsanalyse neuer peroxisomaler Proteine für ein Gesamtverständnis des Organells von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Aspekte zur Untersuchung der Peroxisomen bearbeitet. Dabei stellte die Identifizierung und Funktionsanalyse von potentiellen peroxisomalen Proteinen, unter Verwendung eines reversen genetischen Ansatzes, den Hauptaspekt dar. Die in diesem Rahmen identifizierten Proteine wurden auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht und die Funktionsanalyse erfolgte anhand der jeweiligen Deletionsmutante.

Den zweiten Teil dieser Arbeit bildeten die Analysen zu dem bereits bekannten peroxisomalen Protein Pex11p, das ebenfalls mit Hilfe des reversen genetischen Ansatzes identifiziert wurde (59). Dessen Eigenschaften als potentielles porenbildendes Membranprotein sollten untersucht werden.

4.1 Identifizierung von Proteinen

Der von Erdmann und Blobel (59) beschriebene reverse genetische Ansatz zur Identifizierung peroxisomaler Proteine ermöglichte die Suche nach neuen peroxisomalen Proteinen. Dieser Ansatz führte bisher zur Identifizierung und Charakterisierung wichtiger Peroxine wie Pex11p (59), Pex13p (60) oder Pex8p (196). Ebenso wurden Komponenten der β -Oxidation, Idp3p (98) oder Transportproteine, Ant1p (182) und Fat2p (19) gefunden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der reverse genetische Ansatz zur systematischen Identifizierung peroxisomaler Proteine geeignet ist und dass in Kombination mit sensiblen massenspektrometrischen Methoden (206), die Identifizierung einzelner Proteine auch aus einem Proteingemisch möglich ist.

Mit dieser Methode (59) (Abb. 3.1) wurden 78 Proteinbanden analysiert. Unter Verwendung massenspektrometrischer Methoden (115) konnten 59 verschiedene Proteine identifiziert und für 11 Proteine eine zelluläre Lokalisation bestimmt werden.

Darunter befanden sich auch die drei neuen peroxisomalen Proteine Eci1p (Enoyl-CoA-Isomerase) (78), Dci1p (Dienoyl-CoA-Isomerase) (77) und Tes1p (Thioesterase) (124) (Abb. 3.1, durch rechteckige Umrandungen markiert). Die peroxisomale Lokalisation dieser Proteine wurde durch Analysen bestätigt (79, 125) und resultierte in der Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. J. Gould (Departments of Biological Chemistry, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA).

Zusätzlich zu den mittels massenspektrometrischer Methoden identifizierten Proteinen, erfolgte im Rahmen des reversen genetischen Ansatzes die Isolierung von 3 Proteinen (Abb. 3.1, unterstrichen), deren Sequenzen mittels Peptidsequenzierungen (R. Erdmann, persönliche Mitteilung) identifiziert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zweiter proteomischer Ansatz (Abb. 3.3) etabliert, der zur Identifizierung von 66 Proteinen führte, wobei die subzelluläre Lokalisation von 41 bereits nachgewiesen war. Für 17 Proteine wurde in dieser Studie die subzelluläre Lokalisation untersucht.

4.2 Funktionsanalyse neuer Proteine

4.2.1 Eci1p, Dci1p und Tes1p sind peroxisomal

Die Identifizierung der Proteine Eci1p, Dci1p und Tes1p mittels unterschiedlicher Ansätze führte zur oben genannten Zusammenarbeit der beiden Arbeitsgruppen Erdmann und Gould. Untersuchungen zur Funktionsanalyse dieser Proteine ergaben, dass es sich dabei um eine Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (Eci1p) handelt, ein Enzym, das essentiell für den Abbau von ungesättigten Fettsäuren ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *YLR284C/ECI1* ein Ölsäure-induziertes Gen ist, das ein neues peroxisomales Protein kodiert, und dass die Deletion des Gens zu einem Wachstumsdefekt auf ölsäurehaltigem Medium führt (78).

Für die Dienoyl-CoA-Isomerase (Dci1p) wurde eine akzessorische Rolle bei der Fettsäuredegradation in *S. cerevisiae* angenommen, dabei scheint Dci1p mit Eci1p *in vivo* assoziiert zu sein (77, 268). Die Deletion des entsprechenden Gens *DCI1/YOR180C* verursacht einen milden, aber signifikanten Wachstumsdefekt, wenn Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (77).

Yjr019cp/Tes1p wird von einem Ölsäure-induzierten Gen (*YJR019C*) kodiert. Mittels genetischer und biochemischer Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Acyl-CoA-Thioesterase handelt, die in der Lage ist, die Hydrolyse von Acyl-CoA in freie Fettsäuren und CoA zu katalysieren (124).

4.2.2 Yor084wp

4.2.2.1 Yor084wp gehört zur Lipase-Esterase-Familie

Sequenzanalysen geben häufig erste Hinweise auf mögliche Funktionen eines Proteins. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zum YOR084W führten zur Identifizierung eines Motivs, das für die Enzymaktivität prokaryotischer Lipasen/Esterasen charakteristisch ist (Abb. 3.6). Aufgrund dieses Motivs wurde das Yor084wp als erstes eukaryotisches Mitglied einer bakteriellen Lipase-Esterase-Familie zugeordnet (247), wobei dessen potentielle Hydrolase-Aktivität noch nachzuweisen ist, da die Sequenzanalysen allein es nicht erlauben, Yor084wp als eine in Peroxisomen funktionierende Lipase/Esterase zu betrachten.

4.2.2.2 Yor084wp ist ein peroxisomales Matrixprotein

Der erste Hinweis auf die peroxisomale Lokalisation des Yor084wp wurde durch die beiden experimentellen Ansätze gegeben, über die das Protein identifiziert wurde nachgewiesen wurde (Abb. 3.1 und Abb. 3.3). Die erste Analyse zeigte eine Sedimentation des GFP-Yor084wp in einer subzellulären Fraktionierung (Abb. 3.7). Dabei ist anzumerken, dass eine Fusion mit GFP keinerlei Auswirkungen auf das Sedimentationsverhalten von Fremdproteinen hat (152). Dieses partikuläre Verhalten ließ auf eine Organellen-Assoziation schließen. Sich anschließende Untersuchungen ergaben, dass Yor084wp in Saccharose-Dichtegradienten mit den peroxisomalen Proteinen Fox3p, Pex11p und Katalase kolokalisiert vorlag (Abb. 3.8). Dabei wurden Anteile von Fox3p und Katalase auch in mitochondrialen Fraktionen detektiert, was auf heterogen entwickelte (leichtere) Peroxisomen hindeutet. In Fraktionen des Überstandes wurden geringe Mengen an GFP-Yor084wp zusammen mit den in der peroxisomalen Matrix lokalisierten Proteinen Katalase und Fox3p detektiert. Die Detektion kann auf zerstörte Organellen zurückgeführt werden.

Fusionen des grünen Fluoreszenz Proteins (GFP) mit Fremdproteinen ermöglichen deren subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die GFP-Fusion mit dem N-Terminus des Yor084wp führte zu einem punktierten Verteilungsmuster in der Zelle, das mit dem des peroxisomalen Markers PTS2DsRed (219) übereinstimmte (Abb. 3.9). Diese fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen bestätigten somit die biochemisch gewonnenen Daten einer peroxisomalen Lokalisation (Abb. 3.8). Wurde das Protein jedoch an seinem C-Terminus markiert, kam es aufgrund der Blockierung des QKL-COOH durch das GFP zu einer Mislokalisierung des Fusionskonstruktes ins Cytosol. Die Funktion eines QKL-COOH als peroxisomale Zielsteuerungssequenz (PTS1) in Hefe wurde zuvor mittels eines "Two-Hybrid-Screening-Verfahrens" nachgewiesen (143), dabei wurde die Interaktion des Tripeptids QKL mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p bewiesen.

Yor084wp konnte also nicht nur als ein neues peroxisomales Matrixprotein identifiziert werden, sondern es wurde auch mittels GFP-Fusion und fluoreszenzmikroskopischer Detektion gezeigt, dass das QKL_{-COOH} als eine Variante der PTS1-Sequenz funktioniert. Dieser Hinweis wird durch den Pex5p-abhängigen (PTS1) und Pex7-unabhängigen (PTS2) Import des GFP-Yor084wp zusätzlich bestätigt (Abb. 3.9).

4.2.2.3 Das YOR084W-Gen ist nicht essentiell für die Biogenese von Peroxisomen

Die Lokalisation des Yor084wp weist auf dessen Beteiligung an der Biogenese oder am Stoffwechsel der Peroxisomen hin. Zur Analyse dieses Proteins wurde dessen entsprechende Deletionsmutante untersucht. Ein typisches Merkmal von Mutanten mit einem Defekt in der Biogenese von Peroxisomen ist das mangelhafte Wachstum auf Fettsäuren als alleiniger Kohlenstoffquelle (63). Untersuchungen zum Wachstumsverhalten dieser Mutanten geben daher Aufschluss über die Funktionalität der Peroxisomen. Die *yor084wΔ* Mutante zeigte auf allen untersuchten Kohlenstoffquellen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum (Abb. 3.11). Da aber auch einzelne *pex*-Mutanten (z. B. *pex18Δ*) noch in der Lage sind, Fettsäuren zu verwerten (219), kann aus diesen Ergebnissen nicht geschlossen werden, ob *YOR084W* für die Biogenese der Peroxisomen essentiell ist oder ob die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren von der Gendeletion beeinflusst wird.

4.2.2.4 Untersuchungen zur Funktion des Yor084wp im peroxisomalen Stoffwechsel

Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnte im nicht-codierenden Sequenzabschnitt in 5'-Richtung des *YOR084W*-Gens (Abb. 3.5) ein Bereich identifiziert werden, der der Konsensussequenz eines ORE entspricht ("oleate response element") (51, 129, 202). Dieses DNA-Element kann in Anwesenheit von Ölsäure zu einer verstärkten Expression peroxisomaler Proteine führen (51, 129, 202). Dabei erfahren besonders Proteine der peroxisomalen β -Oxidation eine drastische Expressionssteigerung. Die Ergebnisse der Untersuchungen des RNA-Gehalts in Ölsäure-induzierten Zellen identifizierten *YOR084W* als Ölsäure-reguliertes Gen (Abb. 3.12). Ergebnisse einer Serien-Analyse der Genexpression (SAGE) (125) bestätigten dieses Resultat insofern, dass ein Anstieg der mRNA-Menge in ölsäurehaltigem Medium von 150% festgestellt wurde (125). Diese Hinweise deuten auf eine Beteiligung des Yor084wp am Fettsäurestoffwechsel von Peroxisomen.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass Fettsäuren im Cytosol mit CoA verestert werden, bevor sie in die Peroxisomen gelangen (zum Überblick: (231)). Der Nachweis einer Acyl-CoA-Thioesterase (Tes1p) in Peroxisomen, die Acyl-CoA in freie Fettsäuren und CoA hydrolysiert, führte zu der Vermutung, dass neben aktivierten auch freie Fettsäuren in Peroxisomen existieren und ein alternativer Mechanismus zur Regeneration von freiem CoA im Organell besteht (124). Falls es sich bei Yor084wp um ein peroxisomales Enzym mit

Lipase/Esterase-Aktivität handelt, könnte es in Peroxisomen die Hydrolyse von Lipiden katalysieren und in Verbindung mit Tes1p für die Regulierung der CoA-Menge verantwortlich sein.

Um den Einfluss des *YOR084W*-Gens auf dem Abbau von Lipiden in Peroxisomen zu testen, sollte das Wachstum der Mutante auf Lipiden untersucht werden. Die vermutete Lipase/Esterase-Aktivität könnte außerdem durch eine heterologe Expression des Hefegens in *E. coli* und anschließende enzymatische Messungen bestimmt werden, wie sie auch schon für Triglycerid-Lipasen vorgenommen wurden (240).

4.2.3 Yel020cp

4.2.3.1 Yel020cp ist ein peroxisomales Matrixprotein

Die Identifizierung mittels des reversen genetischen Ansatzes gab den ersten Anhaltspunkt für die peroxisomale Lokalisation des Yel020cp. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und Motivanalysen wurde das Yel020cp als Oxalyl-CoA Decarboxylase bzw. 2-Hydroxyphytanoyl-CoA Lyase bezeichnet und daraufhin den Thiamin-Diphosphat-abhängigen Enzymen zugeordnet (69, 106). Die starke Homologie (40% Identität) zu einer humanen peroxisomalen Lyase (2-HPCL) unterstützte die Vermutungen einer peroxisomalen Lokalisation (Abb. 3.14). Das punktierte Fluoreszenzmuster der GFP-Yel020cp-Fusion und des peroxisomalen Markers PTS2DsRed zeigte, dass es sich bei Yel020cp um ein peroxisomales Protein handelt (Abb. 3.15). Im Gegensatz zur humanen Lyase, die weder eine C- noch eine N-terminale Zielsteuerungssequenz besitzt, verfügt das ScYel020cp über ein C-terminales PRL_{-COOH}, das mit dem humanen PTS1-Rezeptor HsPex5p interagiert (143). Mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen konnte für die humane Lyase aber dennoch eine peroxisomale Lokalisation in Abhängigkeit des PTS1-Rezeptors Pex5p in der Maus nachgewiesen werden (69). Markierte GFP den C-Terminus (PRL_{-COOH}) des Yel020cp, wurde das potentielle PTS1 blockiert und das Fusionskonstrukt ins Cytosol mislokalisiert (Abb. 3.15). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Funktion des C-terminalen Tripeptids als Zielsteuerungssequenz (143). Für die Hefe *S. cerevisiae* ist der fluoreszenzmikroskopische Nachweis dieser Variante der PTS1-Sequenz jedoch neu.

Somit wurde nicht nur Yel020cp als ein zweites neues peroxisomales Matrixprotein, sondern auch PRL_{-COOH} als eine neue Version der PTS1-Konsensussequenz in Hefe gezeigt. Der Hinweis, dass das PRL als PTS1 funktionsfähig ist, wurde durch den Pex5p-abhängigen (PTS1) und Pex7-unabhängigen (PTS2) Import des GFP-Yel020cp in die Matrix der Peroxisomen zusätzlich bestätigt (Abb. 3.15).

Subzelluläre Fraktionierungsstudien stützten die zuvor gewonnenen Ergebnisse. Yel020cp kolokalisierte in Saccharose-Dichtegradienten mit den peroxisomalen Proteinen Fox3p, Pex11p und Katalase (Abb. 3.16), was auf eine peroxisomale Lokalisation des Proteins

hinweist. In Fraktionen des Überstandes wurden die peroxisomalen Matrixproteine Katalase und Fox3p detektiert, deren Mislokalisierung auf zerstörte Organellen zurückgeführt werden kann. Obwohl für Yel020cp auch ein Import in die Matrix gezeigt wurde (Abb. 3.15), wurde es in diesen Fraktionen nicht detektiert. Das Vorkommen von Fox3p in Fraktionen der Mitochondrien (Abb. 3.16, Fraktion 15) kann durch eine Heterogenität der Peroxisomen verursacht sein, so dass diese teilweise mit den leichteren Mitochondrien sedimentierten.

4.2.3.2 Das YEL020C-Gen ist nicht essentiell für die Biogenese von Peroxisomen

Die Lokalisation des Yel020cp in der peroxisomalen Matrix wies zunächst darauf hin, dass das Protein am Stoffwechsel oder an der Biogenese des Organells beteiligt sein könnte. Zur Klärung einer möglichen Bedeutung des Yel020cp für die Peroxisomen wurde die entsprechende Deletionsmutante untersucht. Da in Wachstumsanalysen mit der *yel020cΔ* Mutante kein Defekt auf fettsäurehaltigen Medien beobachtet werden konnte (Abb. 3.17), kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht auf eine essentielle Funktion des YEL020C-Gens im Stoffwechsel oder der Biogenese von Peroxisomen geschlossen werden. Die *yel020cΔ* Mutante scheint auch weiterhin über einen funktionsfähigen β -Oxidations-Mechanismus zu verfügen.

4.2.3.3 Untersuchungen zur Funktion des Yel020cp im peroxisomalen Stoffwechsel

Das mittels Sequenzanalysen gefundene humane Orthologe zu Yel020cp, 2-HPCL, spielt eine wichtige Rolle beim Abbau methylverzweigter Fettsäuren, indem es ein 2-Hydroxy-3-Methylacyl-CoA in Formyl-CoA und 2-Methylaldehyd abbaut (69). Die meisten Fettsäuren werden durch den β -Oxidationsweg metabolisiert. Verzweigte Fettsäuren wie die Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) können aufgrund ihrer β -Methyl-Einheit nicht auf diesem Weg abgebaut werden und müssen stattdessen mittels α -Oxidation zu Pristansäure umgewandelt werden (zur Übersicht: (259)). Dabei werden schrittweise C_1 -Reste entfernt, beginnend mit einer Hydroxylierung. Die α -Oxidation benötigt dazu kein CoA und erzeugt auch kein ATP. In Menschen und Ratten findet dieser untergeordnete Reaktionsweg der Fettsäureoxidation in den Peroxisomen der Leberzellen statt. Die Phytansäure entsteht als Abbauprodukt der Phytylseitenkette von Chlorophyll und wird hauptsächlich mit Milchprodukten und tierischen Fetten über die Nahrung aufgenommen. Patienten mit adultem Refsum-Syndrom, einer peroxisomalen Erkrankung, die auch Phytansäurespeicherkrankheit genannt wird, sind nicht in der Lage, Phytansäure durch α -Oxidation abzubauen (259). Im Gegensatz zu Säugern wurde in Hefe jedoch α -Oxidation verzweigter Fettsäuren noch nicht nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Wachstumsanalysen auf Phytansäure als alleiniger Kohlenstoffquelle führten zu dem

Ergebnis, dass sowohl der Wildtyp als auch die *ye1020cΔ* und *pex*-Mutanten wachsen konnten (Daten nicht gezeigt). Eine Hofbildung, die bei kompletter Verwertung der Fettsäure auf der Agarplatte sichtbar wird, konnte nicht beobachtet werden. Das Wachstum wurde auf den in den Agarplatten enthaltenden Emulgator Tween 40 zurückgeführt, einer Kohlenstoffquelle, die auch alleine zu einem Zellwachstum geführt hat (Daten nicht gezeigt). Ohne die Zugabe des Emulgators war eine gleichmäßige Verteilung der Phytansäure bei der Herstellung der Agarplatten nicht möglich. Deshalb blieben die Fragen bestehen, ob es sich bei *Ye1020cp* tatsächlich um eine 2-Hydroxyphytanoyl-CoA Lyase handelt und ob dieser Stoffwechselweg überhaupt in Hefen existiert. Ebenfalls ungeklärt bleibt, ob es sich bei *Ye1020cp* um eine Oxalyl-CoA Decarboxylase handelt. Denn weder das *Ye1020cp* als Decarboxylase noch die Decarboxylase-Reaktion als solche wurden bislang für die Hefe beschrieben (106). Aufgrund der potentiellen Bindungsstelle für Thiamin-Diphosphat kann *Ye1020cp* lediglich als ein peroxisomales Thiamin-Diphosphat-abhängiges Enzym betrachtet werden. In der Hefe *S. cerevisiae* wurden bislang noch vier andere Enzyme mit Bindungsstellen für Thiamin-Diphosphat identifiziert (*ILV2*, *PDC1*, 5 und 6), die im Cytoplasma (*PDC1*, 5 und 6) oder in den Mitochondrien (*ILV2*) detektiert wurden (106). Mit *Ye1020cp* konnte nach *Yor084wp* ein zweites neues peroxisomales Protein identifiziert werden, welches *Pex5p*-abhängig in die Matrix importiert wird. Die entsprechende Mutante besitzt die Fähigkeit auf langkettigen Fettsäuren zu wachsen, aber die Rolle des Proteins im peroxisomalen Stoffwechsel bleibt ungeklärt.

4.2.4 *Ygl184cp*

4.2.4.1 *Ygl184cp* ist in der peroxisomalen Membran lokalisiert

Den ersten Hinweis auf die peroxisomale Lokalisation des *Ygl184cp*, einem Protein mit starker Ähnlichkeit zu einer Cystathionin- β -Lyase (7), gab die Identifizierung unter potentiellen peroxisomalen Membranproteinen (Abb. 3.3). Untersuchungen der entsprechenden Aminosäuresequenz und die Detektion mit Hilfe der computergestützten Sequenzanalyse CoSMoS ("Context Sensitive Motif Searches") (79) zur Identifizierung von Proteinen mit peroxisomalen Signalsequenzen vom Typ 1 oder 2 bzw. einem "oleat response element" in ihrer Promotorsequenz (*ORE*, (51, 129, 202), unterstützten diesen frühen Anhaltspunkt. Im Rahmen dieser Studie wurde die peroxisomale Lokalisation der GFP-Fusionsprodukte (Abb. 3.19, Abb. 3.20) nachgewiesen. Überraschenderweise führte die Blockierung der vermeintlichen *PTS1*-Sequenz (SKL_{-COOH}) durch das GFP (*Ygl184cp*-GFP) nicht zu der erwarteten cytosolischen Mislokalisierung, wie sie bei *PTS1*-abhängig importierten peroxisomalen Matrixproteinen üblich ist. Die Beobachtung, dass beide Fusionsprodukte in der für Matrixproteine defizienten Mutante *pex13Δ* (60) ein punktiertes

Verteilungsmuster verursachten, in der für peroxisomale Membranen defizienten Mutante *pex19Δ* (84) dagegen eine diffuse Fluoreszenzverteilung hervorriefen, führte zu der Annahme, dass es sich um ein membranständiges Protein handeln könnte. (Abb. 3.20). Die genaue Orientierung an oder in der Membran konnte durch diese Methoden nicht nachgewiesen werden.

Durch Sequenzanalysen mit Hilfe des Programms TMpred (112), im Hinblick auf Transmembranbereiche, konnten zwei potentielle Transmembrandomänen detektiert werden. Ein solches membranständiges Verhalten konnte bereits für das Peroxin Pex8p festgestellt werden, das ebenfalls über eine PTS1-Sequenz (SKL-COOH) verfügt, sich aber in Untersuchungen zur subperoxisomalen Lokalisation wie ein an der Peroxisomenmembran assoziiertes Protein verhält (196). Zu einer genauen Klärung der Lokalisation des Ygl184cp müssten deshalb zusätzlich subperoxisomale Lokalisationsstudien vorgenommen werden.

4.2.4.2 Untersuchungen zur Funktion des Ygl184cp im peroxisomalen Stoffwechsel

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es sich bei Ygl184cp um ein peroxisomales Membranprotein handelt. Die Cystathionin-β-Lyase-Aktivität wurde nicht untersucht. Das Enzym katalysiert einen Zwischenschritt bei der Umwandlung von Methionin zu Cystein. Ob tatsächlich eine Verbindung zwischen diesem Aminosäuremetabolismus und dem peroxisomalen Stoffwechsel besteht, bleibt unbeantwortet. Der Nachweis der an der Biosynthese von Lysin beteiligten Saccharopin-Dehydrogenase in den Peroxisomen (4.2.4) unterstützt die Vermutung, dass bestimmte Abläufe des Aminosäurestoffwechsels in der Hefe in Peroxisomen stattfinden.

Zur Untersuchung einer möglichen Bedeutung des Ygl184cp für den peroxisomalen Stoffwechsel wurde die entsprechende Gendelektionsmutante Wachstumsanalysen unterzogen. Die *ygl184cΔ* Mutante zeigte einen partiellen Wachstumsdefekt auf langkettigen Fettsäuren. Auf Petroselinensäure als alleiniger Kohlenstoffquelle wurde ein eingeschränktes Wachstum beobachtet, wohingegen ölsäurehaltiges Medium keine Auswirkungen auf das Wachstum der Mutante zeigte (Abb. 3.21). Es konnte jedoch ein allgemein schlechteres Wachstum der Zellen auf Petroselinensäure- als auf Ölsäure-Medium beobachtet werden. Diese Experimente geben daher keine Auskunft über einen Einfluss der entsprechenden Gendelektion am peroxisomalen Stoffwechsel.

4.2.5 Yir034cp

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Experimente zur Feststellung der Lokalisation (Abb. 3.23, 3.24) der Saccharopin-Dehydrogenase 1 (Yir034cp/Lys1p, (15)) bestätigten die von Geraghty und Mitarbeitern (79) gemachten Beobachtungen, dass es sich bei diesem Protein um ein peroxisomales Matrixprotein handelt.

Zusätzlich wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass ein Pex5p-abhängiger und Pex7p-unabhängiger Import in die Peroxisomen-Matrix stattfindet (Abb. 3.23). Geraghty und Mitarbeiter konnten keinen Wachstumsdefekt der Mutante auf Ölsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle feststellen (79). Wir erweiterten die Analysen, indem wir zusätzlich Ethanol und Petroselinensäure als alleinige Kohlenstofflieferanten anboten. Ein eingeschränktes Wachstum der *yir034cΔ* Mutante wurde lediglich auf Petroselinensäure detektiert (Abb. 3.25), die eine für Hefen schlecht zu verwertende Kohlenstoffquelle darstellt, so dass von einem generellen Defekt der Biogenese der Peroxisomen oder bei der β -Oxidation nicht ausgegangen werden konnte.

Die Identifizierung der Saccharopin-Dehydrogenase 1 in den Peroxisomen scheint interessant, da dieses Enzym an der Lysin-Biosynthese beteiligt ist. Lys1p wandelt dabei Saccharopin in Lysin und α -Ketoglutarat um und katalysiert auch die Umkehrreaktion (15). Dessen Identifizierung und die eines zweiten an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzyms (Lys4p) in den Peroxisomen (79) führte zu der Hypothese, dass die Lysin-Biosynthese vermutlich in Peroxisomen stattfindet (79). In Analysen zur Lysin-Auxotrophie mit den entsprechenden Mutanten *lys1Δ* und *lys4Δ* und den peroxisomalen Deletionsmutanten *pex8Δ* und *pex15Δ* zeigten alle Mutanten ein mangelhaftes Wachstum auf Lysin-defizientem Medium (79). Diese Ergebnisse stützten die Vermutung, dass die Lysin-Biosynthese in der Hefe in Peroxisomen erfolgt.

4.2.6 Ybl015wp

4.2.6.1 Ybl015wp ist in Peroxisomen und in Mitochondrien lokalisiert

Die Detektion einer Acetyl-CoA-Hydrolase (Ach1p, Ybl015wp) in unseren beiden Ansätzen zur Identifizierung peroxisomaler Proteine (Abb. 3.1), ließ zunächst auf deren peroxisomale Lokalisation schließen. Mittels Datenbankanalysen unter Verwendung des Programms psort (111) wurde eine PTS2-ähnliche Sequenz in der Nähe des N-Terminus zwischen den Aminosäuren 110 und 118 (RIEFFDKHL) gefunden. Das Programm zur Analyse mitochondrialer Zielsteuerungssequenz MitoProt (33) detektierte eine N-terminale Sequenz (Abb. 3.26), so dass daraufhin eine doppelte Lokalisation in Peroxisomen und Mitochondrien in Betracht gezogen wurde.

Studien zur Klärung der subzellulären Lokalisation ergaben, dass sich dieses Protein tatsächlich in Peroxisomen und in Mitochondrien befand. In Saccharose-Dichtegradienten lag das GFP-Fusionsprodukt Ybl015wp-GFP kolokalisiert zu den peroxisomalen Proteinen Katalase, Fox3p und Pex11p, aber ebenso zu den mitochondrialen Markern Fumarase und Mir1p vor (Abb. 3.28).

Markierte das GFP den N-Terminus des Ybl015wp/Ach1p, wurde in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Wildtyps und der peroxisomalen Mutante *pex13Δ* eine diffuse Fluoreszenz im gesamten Cytosol beobachtet (Abb. 3.27). Eine korrekte Zielsteuerung zu Peroxisomen und Mitochondrien mittels der potentiellen PTS2-Signal-Sequenz und der mitochondrialen Sequenz (194) schien verhindert zu werden. Eine solche Beeinflussung des PTS2-Signalweges durch einen Reporter am N-Terminus eines Proteins konnten Rehling und Mitarbeiter (196) bei der Untersuchung des Pex8p nicht feststellen. Das Peroxin Pex8p besitzt neben einer PTS1- auch eine PTS2-Konsensus-Sequenz zwischen den Aminosäuren 103 und 112 und wurde trotz eines N-terminalen Myc-Tags zu den Peroxisomen dirigiert. Markierte das GFP das C-terminalen Ende des Ach1p, zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sowohl eine Kollokalisierung zum mitochondrialen Marker MitoDsRed (168) als auch zum peroxisomalen Marker PTS2DsRed (219) (Abb. 3.27). Der intakte Import in beide Organellen scheint vom N-Terminus des Proteins abzuhängen.

In den peroxisomalen Importmutanten *pex5Δ* und *pex7Δ* konnte stets ein punktiertes Fluoreszenzmuster des Ybl015wp-GFP detektiert werden (Abb. 3.27), da der Import in die Mitochondrien davon unbeeinflusst blieb. Ob Ybl015wp/Ach1p in der peroxisomalen Importmutante für PTS2-haltige Proteine ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert ist, konnte mit diesen Experimenten nicht gezeigt werden.

4.2.6.2 Untersuchungen zur Funktion des Ybl015wp

Die bislang gewonnenen Hinweise, dass es sich um ein peroxisomal und mitochondrial lokalisiertes Protein handelt, wurden durch die Ergebnisse der Wachstumsanalysen der entsprechenden Mutante teilweise gestützt (Abb. 3.30). So zeigten der Wildtyp und die Mutante *ybl015wΔ* keinen Unterschied im Wachstum, wenn Ölsäure (18:1, Δ^9) verwendet wurde. Dagegen wurde bei Kultivierung auf Petroselinssäure (18:1, Δ^6) ein verringertes Wachstum der *ybl015wΔ* Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Abb. 3.30). Eine Beeinträchtigung der Biogenese der Peroxisomen scheint durch die Deletion des *ACH1*-Gens nicht vorhanden zu sein. Die Hefe *S. cerevisiae* ist in der Lage, auf Ethanol oder Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Ethanol wird dabei zu Acetat umgewandelt (über Acetaldehyd) und Acetat wird zu Acetyl-CoA aktiviert, das dann in den Krebszyklus oder Glyoxylatzyklus eintritt. Zellen, denen das *ACH1*-Gen fehlte, waren nicht mehr fähig, Ethanol und Acetat zu verwerten (Abb. 3.30). Diese Beobachtung deutete auf eine Beeinträchtigung im mitochondrialen Stoffwechsel hin.

Für Ach1p wurde in Hefe zuvor noch keine Lokalisation gezeigt. In Säugern fand man eine Variante des Enzyms in Mitochondrien des braunen Fettgewebes von Winterschlafhaltenden Tieren (147). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass diese Acetyl-CoA-

Hydrolase in Peroxisomen und in Mitochondrien vorkommt. Untersuchungen zur Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität ergaben, dass das Enzym bei der Regulation der intrazellulären Acetyl-CoA- oder CoASH-Menge eine wichtige Rolle spielt (146). Für den Krebs-Zyklus wird Acetyl-CoA in den Mitochondrien benötigt, die Ach1p reguliert dort die zur Verfügung stehende Menge an Acetyl-CoA. Da die β -Oxidation, bei der ebenfalls Acetyl-CoA entsteht, in Hefen ausschließlich in den Peroxisomen stattfindet, könnte die Ach1p auch in diesem Organell regulierend eingreifen.

4.2.7 Ycr091wp konnte in Peroxisomen und Mitochondrien nachgewiesen werden

Zur Bestimmung von Funktion und Lokalisation geben Sequenzanalysen eines identifizierten Proteins oft erste Hinweise. Die in dieser Arbeit durchgeführten Datenbank-Analysen zu Ycr091wp, unter Verwendung des Programms BLASTP (6), führten zur Identifizierung eines sequenzähnlichen Proteins Ynr047wp (40% Identität, 36% Ähnlichkeit), das zur Klasse der Serin/Threonin-Kinasen gehört. Mit Hilfe des ClustalW-Programms (103) wurden die Aminosäuresequenzen dieser Proteine mit den beiden Serin/Threonin-Kinasen Kin3p und Kin4p verglichen. Dabei konnte in jedem Protein mindestens ein Motiv identifiziert werden, das für diese Kinasen charakteristisch ist (Abb. 3.32). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und der Existenz des Kinase-Motivs kann Ycr091wp zu den Kinasen gezählt werden.

Die Identifizierung unter den Hochsalz-resistenten potentiellen Membranproteinen (Abb. 3.3) und Sequenzanalysen im Hinblick auf Transmembranbereiche (Abb. 3.31) führten zu der Vermutung, dass diese potentielle Kinase mit der peroxisomalen Membran assoziiert sein könnte. Subzelluläre Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigten diese Annahme (Abb. 3.33). In Fraktionierungsexperimenten konnte das GFP-Ycr091wp nicht nachgewiesen werden. Warum in diesem Fall keine Detektion des GFP-Produktes möglich war ist nicht nachzuvollziehen. Eine anschließend durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenz im Hinblick auf Signalsequenzen (Abb. 3.31) und eine beobachtete Kolokalisation mit einem Mitochondrienmarker gaben Grund zur Annahme, dass ebenfalls eine Assoziation mit Mitochondrien besteht (Abb. 3.33). Demnach scheint die Serin/Threonin-Kinase in beiden Organellen vorzukommen. Die vorgenommenen Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der entsprechenden Mutante *ycr091w* Δ auf verschiedenen Kohlenstoffquellen ergaben allerdings keine weiteren Anhaltspunkte für eine essentielle Bedeutung des *YCR091W*-Gens am peroxisomalen oder mitochondrialen Stoffwechsel, da die Gendeletion das Zellwachstum nicht beeinflusste (Abb. 3.34).

Bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen spielen Serin/Threonin-Kinasen als Überträger von Phosphatgruppen eine wichtige Rolle. Die Identifizierung dieser Kinase in Peroxisomen und Mitochondrien lässt vermuten, dass Proteinmodifikationen in diesen

Organellen stattfinden können. Der Nachweis von phosphorylierten Peroxinen, wie Pex14p (nur in *Pichia pastoris*) (121) und Pex15p (56), die Entdeckung einer Phosphorylierungsstelle an der peroxisomalen Acyl-CoA-Synthetase Faa2p (205) und die Regulierung von Dehydrogenasen durch Kinasen in Mitochondrien (110) führten zu der Annahme, dass Proteinmodifikationen in den Peroxisomen und Mitochondrien stattfinden können und von sich vor Ort befindenden Kinasen katalysiert werden.

4.2.8 Yor228cp ist ein mitochondriales Protein

Die Organellenseparation mittels Saccharose-Dichtegradienten und isopyknischer Zentrifugation erlaubte eine Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien. Dabei konnten Verunreinigungen mit anderen Organellenbestandteilen jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. So wurden zusammen mit peroxisomalen Proteinen auch neue, bisher nicht charakterisierte, mitochondriale Proteine detektiert.

Zu diesen Kontaminationen mitochondrialer Proteine gehörte ein bislang unbekanntes Protein mit dem ORF YOR228C.

Die Untersuchungen zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation ergaben eine deutliche Kolokalisation des Yor228cp mit dem mitochondrialen Membranprotein Mir1p und der Fumarase (Abb. 3.37) in Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtungen mittels Fluoreszenzmikroskopie gestützt (Abb. 3.36). Ein punktiertes Fluoreszenzmuster wurde sowohl in den Zellen des Wildtyps als auch in den Mutanten des peroxisomalen Imports für Matrix- (*pex13Δ*) und Membranproteine (*pex19Δ*) festgestellt (Abb. 3.36), so dass eine peroxisomale Lokalisation nicht in Frage kommt und von einem neuen mitochondrialen Protein ausgegangen werden konnte. Detektierte Transmembranbereiche und die schwache Ähnlichkeit zu einem unbekanntem Membranprotein lassen auf eine Lokalisation in der Mitochondrienmembran schließen. Weil Analysen unter Verwendung der Programme psort (111) und MitoProt (33) keine Anhaltspunkte auf eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz gaben, könnte diese vor dem Inserieren in die Mitochondrienmembran abgespalten werden, wie es für mitochondriale Proteine häufig ist (194).

Da das Wachstum der entsprechenden *yor228cΔ* Mutante auf verschiedenen Kohlenstoffquellen mit dem des Wildtyps vergleichbar war, konnten aus diesen Ergebnissen keine Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins getroffen werden. Die Rolle des Proteins in den Mitochondrien bleibt weiterhin ungeklärt.

4.2.9 Ylr095wp/Sfc1p ist ein mitochondriales Protein

Der Succinat-Fumarat-Transporter Sfc1p/Ylr095wp gehört zur Familie der mitochondrialen Transporter (181). Die Funktion als Transporter in der inneren Mitochondrienmembran

konnte durch bakterielle Expression und Rekonstitution in Liposomen bereits nachgewiesen werden (181). Dieser Proteinfamilie wurden bereits 35 Proteine zugeordnet. Darunter auch peroxisomale Proteine. Zu den peroxisomalen Mitgliedern zählt das menschliche Pmp34p (265), ein Pmp47p aus *Candida boidinii* (116, 159), ein menschlicher Ca^{2+} -abhängiger Transporter (255) und das kürzlich in *S. cerevisiae* identifizierte Ant1p (182). Aufgrund der Identifizierung unter potentiellen peroxisomalen Membranproteinen (Abb. 3.3) wurde eine zusätzliche peroxisomale Lokalisation des Sfc1p/Ylr095wp vermutet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen deuteten zuerst auf eine doppelte Lokalisation in Mitochondrien und Peroxisomen hin (Abb.3.41), da die Kolokalisation des GFP-Produkts mit dem peroxisomalen Marker keine eindeutige Interpretation zuließ. Die Lokalisation in mitochondrialen Fraktionen von Saccharose- und Accudenz-Dichtegradienten (Abb. 3.42 und Abb. 3.43) widerlegte die vermutete zweifache Lokalisation in beiden Organellen.

Zur Klärung einer möglichen Bedeutung des *YJR095W*-Gens für die Funktion der Peroxisomen wurde die dazugehörige Mutante auf ihr Wachstumsverhalten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Die Mutante *yjr095w* Δ zeigte ein eingeschränktes Wachstum auf den Fettsäuren und auf Ethanol (Abb. 3.44). Der von Palmieri und Mitarbeitern (181) zusätzlich nachgewiesene Wachstumsdefekt auf Acetat, konnte nicht bestätigt werden. Die hiermit gewonnenen Erkenntnisse stehen dennoch im Einklang mit den Ergebnissen von Palmieri *et al.* (181), die darüber hinaus Sfc1p als einen mitochondrialen Succinat-Fumarat-Transporter charakterisierten.

Die Identifizierung dieses Proteins der mitochondrialen Transporter-Familie sollte deshalb als Kontamination der Aufarbeitung gesehen werden. Mittels biochemischer und immunologischer Studien zur Klärung der Lokalisation konnten weitere Proteine dieser Familie als peroxisomal identifiziert werden (L. Palmieri, H. Rottensteiner, unveröffentlichte Daten).

4.2.10 Yhr199cp ist ein mitochondriales Protein

Analysen der Aminosäuresequenz des Yhr199cp unter Verwendung der Programme psort (111) und MitoProt (33) zur Identifizierung möglicher Zielsteuerungssequenzen, deuteten auf eine mitochondriale Lokalisation. Die sich anschließenden subzellulären Untersuchungen erbrachten nur mittels Saccharose-Dichtegradienten verwertbare Ergebnisse. Eine Lokalisation des Yhr199cp konnte in den mitochondrialen Fraktionen kolokalisiert zu den mitochondrialen Proteinen Mir1p und Fumarase eines Saccharose-Dichtegradienten nachgewiesen werden (Abb. 3.45). Dieses Ergebnis konnte aber mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht verifiziert werden. Aufgrund der mangelhaften Expression der

GFP-Konstrukte war eine Aussage zur Lokalisation des Yhr199cp mittels dieser Methode nicht möglich.

Zur Klärung einer möglichen Bedeutung des *YHR199C*-Gens für die Funktion der Peroxisomen wurde auch hier die dazugehörige Mutante auf ihr Wachstumsverhalten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Die *yhr199cΔ* Mutante zeigte sowohl auf den Fettsäuren Ölsäure und Petroselinensäure als auch auf Ethanol und Acetat ein eingeschränktes Wachstum (Abb. 3.44) und verhält sich somit ähnlich wie der zuvor erwähnte mitochondriale Transporter Sfc1p (Kap. 4.2.8), so dass daraufhin eine mitochondriale Lokalisation angenommen wurde.

Die Vermutung, dass es sich bei Yhr199cp um ein mitochondriales Protein handelt, konnte durch die Sequenzanalysen, subzelluläre Lokalisationsstudien in Dichtegradienten und Wachstumsuntersuchungen bestätigt werden. Die zelluläre Rolle des Proteins bleibt weiter ungeklärt.

4.2.11 Ist Yal054cp peroxisomal?

Die Identifizierung der Acetyl-CoA-Synthetase Acs1p (Yal054cp) in der Fraktion der peroxisomalen Membranproteine (Abb. 3.3), eine detektierte VKL_{-COOH}-Sequenz am extremen C-Terminus (Abb. 3.47) und eine Sequenzähnlichkeit zu dem peroxisomalen Fat2p ließen zunächst eine peroxisomale Lokalisation vermuten.

In den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen zeigten die Fusionsproteine GFP-Yal054cp und Yal054cp-GFP zwar ein punktiertes Verteilungsmuster, welches aber weder mit dem Muster des peroxisomalen Markers PTS2DsRed (Abb. 3.48), noch mit dem des Mitochondrienmarkers (nicht gezeigt) übereinstimmte. Die Analyse der Lokalisation des GFP-Fusionskonstruktes in den Importmutanten für peroxisomale Matrix- (*pex5Δ*, *pex7Δ* und *pex13Δ*) und Membranproteine (*pex19Δ*) ergab, dass es sich bei der Acetyl-CoA-Synthetase Acs1p weder um ein peroxisomales Matrix- noch um ein Membranprotein handelt (Abb. 3.48).

Anschließende Untersuchungen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation bestätigten die zuvor gemachten Beobachtungen, dass die Acs1p nicht peroxisomal ist (Abb. 3.49). Nur mit einer extremen Überexposition der ECL-Detektion konnte eine schwache Kolo-kalisation mit den peroxisomalen Proteinen Katalase, Fox3p und Pex11p gezeigt werden. Diese mögliche Kolo-kalisation mit peroxisomalen Proteinen wurde aber auch bei der im Cytosol lokalisierten Pgc1p festgestellt (Abb. 3.49), so dass die Detektion in peroxisomalen Fraktionen als Kontamination betrachtet werden muss. Das punktierte Verteilungsmuster der GFP-Konstrukte Yal054cp-GFP und GFP-Yal054cp widerspricht einer cytosolischen Lokalisation, die sich in einer diffusen Fluoreszenz geäußert hätte. Es könnte sich um eine Organellen-Assoziation des Proteins oder um cytosolische Protein-Aggregate handeln, die dieses

punktierte Erscheinungsbild verursachten. Die Vermutung könnte experimentell durch Flotationsanalysen in Saccharose-Dichtegradienten untersucht werden. Die von De Virgilio *et al.* (41) als PTS1 postulierte C-terminale VKL-COOH-Sequenz, die später in Studien von Lametschwandner *et al.* (143) als funktionell bestätigt wurde, scheint die Acs1p also nicht zu den Peroxisomen zu dirigieren.

Eine Analyse der DNA-Sequenz des *ACS1*-Gens führte zur Identifizierung zweier Start-Codons (Abb. 3.47, fett markiert). Beide Start-Codons liegen im selben Leserahmen und können als Translationsstart in Frage kommen (32, 148). Es besteht daher die Möglichkeit, dass das *ACS1*-Gen zwei Proteine mit unterschiedlichen N-Termini kodiert. Frühe Studien von Klein und Jahnke (132, 133) gaben Grund zu der Annahme, dass die Acs1p, abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle, in mikrosomalen oder mitochondrialen Fraktionen zu finden ist. Eine Kollokalisierung mit mitochondrialen Proteinen wurde nicht festgestellt. Die Identifizierung der Acs1p in leichteren Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 3.49, Fraktionen 23-29) könnte in diesem Fall auf eine mikrosomale Lokalisation zurückgeführt werden. Lipid-Partikel konnten in Fraktion 15 nachgewiesen werden (Abb. 3.52, Tgl1p), so dass das punktierte Verteilungsmuster nicht von einer Lokalisation in Lipid-Partikeln stammte. Das als Markerprotein für Lipid-Partikel und ER (Abb. 3.52) dienende Protein Erg6p (8) kann keinen Hinweis auf eine Lokalisation des Acs1p im ER geben, da es in nahezu allen Fraktionen detektiert wurde (Abb. 3.52). Ob der physiologische Zustand der Zelle tatsächlich Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat, müsste in Experimenten mit wechselnden Induktionsbedingungen näher untersucht werden. In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurden die Zellen zur Induktion der Peroxisomen in Ölsäuremedium inkubiert. Der Überschuss an Fettsäure führte zu einer verstärkt ablaufenden β -Oxidation der Peroxisomen und so wurde genügend Acetyl-CoA produziert, dass die Aktivität der Acetyl-CoA-Synthetase nicht erforderlich wurde. Ein Mangel an Acetyl-CoA in Peroxisomen und Mitochondrien und ein damit verbundener Bedarf an der Acetyl-CoA-Synthetase könnten dann zu einem Import in die Organellen führen. Die PTS1-Sequenz am extremen C-Terminus des Proteins könnte zum peroxisomalen Import genutzt werden.

Wachstumsanalysen der *yal054c* Δ Mutante auf verschiedenen Kohlenstoffquellen zur Feststellung einer Bedeutung des *YAL054C*-Gens für die Funktion der Peroxisomen zeigten, dass die Mutante in ihrem Wachstum beeinträchtigt war, wenn Ölsäure oder Petroselinensäure als alleinige Kohlenstoffquellen zur Verfügung standen. Ethanol dagegen verursachte eine minimale Reduktion im Wachstum (Abb. 3.50). Dieser Effekt kann auf Störungen der peroxisomalen Biogenese oder der Funktion der Peroxisomen im Rahmen der β -Oxidation zurückgeführt werden (63).

4.2.12 Für 22 Proteine konnte keine peroxisomale Lokalisation festgestellt werden

Neben den Untersuchungen zur Lokalisation dieser Proteine, bildeten die Analysen der entsprechenden Deletionsmutanten einen zweiten Schwerpunkt. Da eine peroxisomale Lokalisation und damit verbundene Bedeutung für die Peroxisomen zunächst angenommen wurde, wurden die Mutanten auf Wachstumsdefekte auf Ölsäure, Petroselinssäure und Ethanol getestet, mit dem Resultat, dass alle vorhandenen Mutanten ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigten (Tab. 3.1). Die Ausnahme bildete die Mutante zu Vam6p, die einen generellen Wachstumsdefekt auf allen Medien besaß.

4.2.12.1 Proteine der Lipid-Partikel

Da Triglycerid-Lipasen bislang nur in Lipid-Partikel detektiert wurden (8), überraschte das Vorkommen von zwei Triglycerid-Lipasen Tgl1p (3) und Tgl2p (240) in der peroxisomalen Präparation.

Die erste Vermutung einer peroxisomalen Lokalisation konnte nicht bestätigt werden. Das punktierte Verteilungsmuster der GFP-Fusionsprodukte stimmte weder für die Tgl1p, noch für die Tgl2p mit dem des peroxisomalen Markers überein (Abb. 3.51). Der immunologische Nachweis der Tgl1p erfolgte zusammen mit einem Lipid-Partikel-Marker (Erg6p) in Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 3.52), so dass die zuvor von Athenstädt *et al.* (8) gemachten Beobachtungen bestätigt werden konnten. Obwohl diese (8) eine unspezifische Isolierung anderer Proteine mit Lipid-Partikeln aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit ihres Ansatzes ausschlossen, identifizierten sie den peroxisomalen Fettsäure-Transporter Fat1p (254). Die Identifizierung einer weiteren potentiellen peroxisomalen Lipase (YBR204C) mit einer PTS1-Sequenz (SKL) und starker Ähnlichkeit (20%) zu den beiden Triglycerid-Lipasen (29), bekräftigt, dass eine direkte oder indirekte Verbindung zwischen Lipid-Partikeln und Peroxisomen nicht vollkommen ausgeschlossen werden sollte.

4.2.12.2 Cytosolische Proteine

Die zweifache Identifizierung einer Ligase mit einer Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität (Faa1p), die als cytosolische Komponente zusammen mit der Faa4p für die Aktivierung endogener Fettsäuren benötigt wird (120), überraschte zunächst. Faa1p ist zu 29% zu der peroxisomalen Faa2p identisch. Eine zusätzliche Assoziation mit Peroxisomen könnte für die Faa1p in Frage kommen. Eine ausschließlich cytosolische Lokalisation wurde schon durch die Identifizierung der Faa1p und der Faa4p in einem Ansatz zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen aus Lipid-Partikeln in Frage gestellt (8).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GFP-Markierungen der Faa1p bestätigten jedoch die zuvor gemachten Beobachtungen einer cytosolischen Lokalisation (Abb. 3.53). Da Faa2p ebenfalls in unseren proteomischen Ansätzen gefunden wurde (Abb. 3.1), kann das Vorkommen der Faa1p in den peroxisomalen Präparationen durch eine Assoziation beider Proteine verursacht worden sein.

Acht weitere cytosolische Proteine

Für acht weitere Proteine unserer Analysen konnte nach fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung eine cytosolische Lokalisation, die durch eine diffuse Fluoreszenz charakterisiert ist, festgestellt werden.

Zu diesen Proteinen gehörte ein hypothetisches Protein, das von dem *YAL032C*-Gen kodiert wird. Diesem Protein konnte erstmals eine cytosolische Lokalisation, jedoch keine zelluläre Rolle zugeordnet werden.

Eine Geranyl-Geranyl-Transferase- α -Untereinheit (*BET4*, YJL031C), die den Transfer einer Geranyl-Geranyl-Einheit von Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat zu Proteinen mit einem CAAX-Motiv katalysiert (119, 263), konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen im Cytosol nachgewiesen werden. Die konservierte Sequenz eines CAAX-Motivs wurde als Ziel für die Isoprenylierung zahlreicher Proteine nachgewiesen (176), wobei die Aminosäure an der X-Position des CAAX die Art der Isoprenylgruppe bestimmt. Proteine mit Alanin, Serin, Methionin, Cystein oder Glutamin werden in der Regel farnesyliert, wohingegen ein Leucin an der X-Position ein Protein markiert, das mit einer Geranyl-Geranyl-Einheit versehen wird (176). Das Peroxin Pex19p besitzt eine CKQQ-Sequenz am C-Terminus und wird aufgrund des Glutamins mittels einer Farnesylierung an der peroxisomalen Membran verankert (84). Bet4p ist somit nicht für die Prenylierung von Pex19p verantwortlich und ein Geranyl-Geranol-Anker an einem peroxisomalen Membranprotein konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Für ein bislang unbekanntes Protein mit dem ORF YNR021W, für das keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen gefunden wurden, konnte ebenfalls ein diffuses Leuchten und eine damit verbundene cytosolische Lokalisation beobachtet werden.

Gleichfalls scheint ein noch weitgehend unerforschtes Protein (YKL091C), das aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Sec14p (Datenbank-Angaben, (162)), welches für den Transport sekretorischer Proteine vom Golgi-Apparat benötigt wird, ebenfalls nicht mit Peroxisomen assoziiert zu sein.

Die am Aminosäuremetabolismus beteiligte S-Adenosylmethionin Synthetase 2, (SAM2, YDR502C; (228)), deren zelluläre Lokalisation bislang unklar war, konnte nach fluoreszenzmikroskopischer Analyse ebenfalls in diese Gruppe der cytosolischen Proteine eingeordnet werden.

Die beiden als Translations-Elongations-Faktoren charakterisierten identischen Proteine TEF1, YPR080C und TEF2, YBR118W (99) müssen als Kontaminationen der Aufarbeitung betrachtet werden. Sie werden generell stark exprimiert (Gavin *et al.*, 2002) und wurden auch in anderen proteomischen Ansätzen zur Identifizierung von Proteinen aus *S. cerevisiae* als Kontaminationen, zum Teil in Leer-Kontrollen, detektiert (76, 125).

Die Identifizierung eines zur Hsp70-Familie gehörenden Proteins (Pdr13p), das von dem *YHR064C*-Gen kodiert wird, führte zur Annahme, ein peroxisomales Chaperon gefunden zu haben. Dass Chaperone, wie das Hsp70p und das cytosolische DnaJ-ähnliche Djp1p, bei beiden peroxisomalen Importwegen (PTS1 und PTS2) an der Substraterkennung bzw. der Zielsteuerung der Substrat-Rezeptor-Komplexe in die peroxisomale Matrix beteiligt sind, konnte bereits mehrfach gezeigt werden (100, 250). Ein in Peroxisomen lokalisiertes Chaperon wurde bisher noch nicht beschrieben. Das Pdr13p wurde im Cytosol nachgewiesen (Abb. 3.55). Die postulierte cytoplasmatische Lokalisation (93) konnte somit bestätigt werden. Sie steht im Einklang mit der kürzlich aufgestellten Hypothese von Gould und Collins (85), dass Peroxisomen keine intraperoxisomalen Chaperone benötigen, da die Proteine bereits gefaltet importiert werden.

Bei allen in dieser Arbeit cytosolisch nachgewiesenen Proteinen sollte in Erwägung gezogen werden, dass die Klonierung unter Verwendung eines starken Met25-Promotors zur GFP-Markierung auch die Lokalisation des einzelnen Proteins beeinflussen kann.

4.2.12.3 Proteine mit ungeklärter Lokalisation

Ygl037cp

Eine interessante Beobachtung konnte in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse für das bislang unbekannt Protein Ygl037cp gemacht werden. Die Ygl037cp-GFP-Fusion zeigte in der Fluoreszenzmikroskopie eine stäbchenförmige Struktur (Abb. 3.56), die die gesamte Zelle durchspannte. Diese Struktur wurde in Hefezellen auch für Actinfilamente und Mikrotubuli gefunden (109, 156). In diesen Studien konnte eine Kollokalisierung von peroxisomalen Proteinen und Actinfilamenten und eine Mobilität von Peroxisomen entlang dieser Actinfilamente belegt werden, wohingegen eine Verbindung zwischen Mikrotubuli und Peroxisomen ausgeschlossen wurde. Eine Kollokalisierung des Ygl037cp mit dem peroxisomalen Marker wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt, so dass in Erwägung gezogen wird, dass es sich um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein handelt.

Yol041cp

Die in dieser Studie gewonnenen fluoreszenzmikroskopischen Daten für das Protein Nop12p (Yol041cp) schienen auf eine Lokalisation im Zellkern oder der Vakuole hinzudeuten, da ein einzelner grüner Fluoreszenzpunkt in der Zelle sichtbar war, der sich deutlich vom Fluoreszenzmuster des peroxisomalen Markers unterschied (Abb. 3.57). Eine am extremen C-Terminus detektierte potentielle PTS1-Signalsequenz (SKK) dirigierte das Protein also nicht zu den Peroxisomen. In weitgehender Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in der Zwischenzeit eine nukleoläre Lokalisation nachgewiesen und publiziert (264).

Für fünf identifizierte Proteine konnte keine eindeutige Lokalisation nach Betrachtung der GFP-Fusionsprodukte gezeigt werden (Abb. 3.58). Bei keinem der Proteine konnte eine Kolo­kalisierung mit einem der beiden Organellenmarker (PTS2DsRed, MitoDsRed) festgestellt werden, auch eine ausschließlich cytosolische Lokalisation konnte nicht beobachtet werden.

Zu dieser Gruppe gehört das als Bul1p (Ymr275cp) bezeichnete Protein, das bei der Ubiquitinierung und einem damit verbundenen Abbau von Proteinen in der Zelle eine Rolle spielt (269). Die punktierte Fluoreszenz deutete einerseits auf eine vakuoläre Lokalisation, die auch durch degradiertes Protein zustande gekommen sein kann. Andererseits konnten stärker fluoreszierende Plasmamembranbereiche und cytosolisches Leuchten (Abb. 3.58) beobachtet werden, so dass aus diesen Experimenten keine eindeutige Zuordnung zu einem Organell erfolgen konnte.

Das Protein mit dem ORF YPR003C wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu einer Sulfat-Permease 1 (26% Identität) als ein Mitglied einer Sulfat-Permease-Familie von Membrantransportern betrachtet (186). Es könnte als Transporter in Organellenmembranen vorkommen. Die beobachtete punktierte Fluoreszenz deutet auf eine Assoziation mit Membranen von Organellen hin, die sich, wie die Peroxisomen, über die Zelle verteilen. Eine Assoziation mit peroxisomalen Membranen wurde in den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen jedoch nicht festgestellt, da sich die Fluoreszenzpunkte nicht mit denen des Markers für Peroxisomen (PTS2DsRed) (219) deckten (Abb. 3.58).

Ein Protein (YMR233W), dessen zelluläre Rolle bislang noch unbekannt ist, das aber eine Ähnlichkeit zu einem Protein der Zellknospung (Bud7p; (47)) besitzt, zeigte einen singulären Fluoreszenzpunkt am Zellrand (Abb. 3.58). Diese Fluoreszenz des Proteins könnte darauf hinweisen, dass eine Beteiligung an der Abknospung von Tochterzellen besteht. Durch eine Markierung des Bud7p mit dem roten Fluoreszenzprotein DsRed könnte eine mögliche Kolo­kalisierung der beiden Proteine festgestellt werden.

Das als C-3 Sterol-Dehydrogenase identifizierte Protein Ygl001cp/Erg26p (73), zeigte einen Fluoreszenzpunkt (Abb. 3.58), der auf eine vakuoläre Lokalisation deutet. Diese wurde aber in dieser Arbeit nicht experimentell belegt. Eine Markierung der Vakuole mit dem Farbstoff "Luzifer-Gelb" könnte mittels Fluoreszenzmikroskopie Aufschluss über eine potentielle Kolokalisation des GFP-markierten Proteins mit vakuolären Proteinen geben. Jedoch sollte auch in Erwägung gezogen werden, dass es sich hierbei möglicherweise nicht um den Funktionsort des Proteins, sondern um bereits degradiertes Protein handelt, das zur Vakuole transportiert wurde. Als Komponente der Ergosterol-Biosynthese könnte Erg26p eher in Lipid-Partikeln oder am ER lokalisiert sein (39).

Ein weiteres unbekanntes Protein (YGR086C) zeigte je nach Kopplung mit dem Fluoreszenzmarker GFP ein unterschiedliches Fluoreszenzmuster: Bei der Betrachtung des N-terminalen Fusionskonstruktes (GFP-YGR086C) wurde ein einzelner leuchtender Fleck in der Zelle beobachtet, die C-terminale Fusion zeigte einerseits ein cytosolisches Leuchten über die gesamte Zelle verteilt, doch in einer anderen Aufnahme konnte eine verstärkte ringförmige Fluoreszenz, die von der Plasmamembran herrühren könnte, detektiert werden (Abb. 3.58). Die Variation im Fluoreszenzmuster ähnelt der des Bul1p (Ymr275cp; siehe oben). Vielleicht handelt es sich bei beiden Proteinen um Proteine der Plasmamembran (ringförmige Fluoreszenz), deren Degradation in der Vakuole (punktuelle Fluoreszenz) beobachtet werden konnte. Einzelne Zellen mit cytosolischer Fluoreszenz konnten in der Fluoreszenzmikroskopie neben Zellen mit punktierten Verteilungsmustern sowohl für die GFP-fusionierten Proteine als auch für PTS2DsRed häufig beobachtet werden. Die Ursache kann in einer unvollständigen Reifung des Fluoreszenzproteins liegen, wie es für DsRed beschrieben wurde (10). Es kann sich bei diesen cytosolisch leuchtenden Zellen aber auch um bereits abgestorbene Zellen handeln.

Eine besondere Rolle spielte das identifizierte Protein Vam6p (Ydl077cp), das an der Vakuolenbildung beteiligt sein soll (171). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der GFP-Fusionskonstrukte konnte weder eine diffuse noch eine punktierte Fluoreszenz beobachtet werden. Eine Zuordnung zu einem bestimmten Zellkompartiment oder dem Cytosol konnte daher nicht erfolgen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Beobachtungen, dass GFP-Fusionen mit Vam-Proteinen keine Fluoreszenzsignale erzeugen (171). Als einziges Protein dieser Studie wurden bei dessen Mutante auch Wachstumsdefizite sowohl auf Glukose- als auch auf fettsäure- und ethanolhaltigem Medium festgestellt, obwohl in früheren Studien keine Letalität festgestellt wurde (201) (Tab. 3.1), so dass ein Einfluss des Gens auf die Funktion von Peroxisomen nicht gezeigt werden konnte.

4.2.13 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 Peptidsequenzierung (R. Erdmann, persönliche Mitteilung) identifiziert wurden. Aufgrund ihrer Molekulargewichte und der Isolierung von Hochsalzresistenten Proteinen (peroxisomale Membranproteine) (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 Identifizierungen.

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).

Dagegen bleibt die subzelluläre Lokalisation der beiden potentiellen peroxisomalen Membranproteine Pmp17p/Ycl056cp 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 subzelluläre Zuordnung konnte aus den so gewonnenen Daten nicht erfolgen.

4.2.14 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus den analysierten Proteinen zwei bislang unbekannte Proteine als neue peroxisomale Proteine charakterisiert werden, ein bisher der peroxisomalen Matrix zugeordnetes Protein wurde als Membranprotein identifiziert. Zwei Proteine zeigten eine doppelte Lokalisation in Peroxisomen und in Mitochondrien und zwei bisher unbekannte Proteinen sind in Mitochondrien lokalisiert. Ein als Kontrolle dienendes peroxisomales Protein wurde erfolgreich in Peroxisomen detektiert. Die Identifizierung von Proteinen, die nicht in Peroxisomen lokalisiert sind, hängt vermutlich mit dem Grad der Aufreinigung peroxisomaler Proteine aus Dichtegradienten und der Sensibilität der massenspektrometrischen Methoden zusammen, die auch die Identifizierung von kontaminierenden Proteinen in geringen Mengen zulassen. Besonders die Kontaminationen mit mitochondrialen Proteinen kommen durch ein ähnliches Sedimentationsverhalten der beiden Organellen zustande, die sich auch nur geringfügig in ihrer Dichte unterscheiden.

4.3 Funktionsanalysen zu Pex11p

Pex11p wird zwar zu den Peroxinen gezählt, aber Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass es weder am Import peroxisomaler Matrixproteine, noch an der Bildung von Membranen beteiligt ist. Jedoch scheint Pex11p eine zur Teilung stimulierende Funktion einzunehmen (59, 154, 184, 208). Eine Überexpression des Proteins führt zu einer vermehrten Zahl kleiner Peroxisomen in der Zelle, wohingegen eine Deletion des *PEX11*-Gens die Ausbildung nur weniger, vergrößerter Peroxisomen verursacht (59, 153, 154, 208). Weitere Untersuchungen an Pex11p lassen die Annahme zu, dass das Protein direkt oder indirekt am Abbau mittellanger Fettsäuren beteiligt ist (243).

Bislang konnten nur wenige peroxisomale Proteine mit Ähnlichkeiten zu Transportern kleiner Moleküle identifiziert werden. In Säugern existieren vier verschiedene ABC-Halbtransporter ("ATP-binding cassette") (209), in Hefe sind Pat1p und Pat2p (Pxa2p/Pxa1p) vor allem am Transport von Acyl-CoA beteiligt (101, 210). Das kürzlich in der Hefe *S. cerevisiae* identifizierte peroxisomale Ant1p (182) gehört zusammen mit dem menschlichen Pmp34p (265) und dem Pmp47p aus *Candida boidinii* (116, 158, 159) zur Familie der mitochondrialen Transporter (179, 248). Ein Transportprotein in Form eines Kanals wurde bislang in peroxisomalen Membranen von Hefen noch nicht nachgewiesen.

Sequenzvergleiche peroxisomaler Porine in Pflanzen ergaben Ähnlichkeiten zum *ScPEX11* (persönliche Mitteilung S. Reumann). Aufgrund dieser ersten Hinweise wurde eine neue potentielle Funktion des Pex11p als porenformendes Protein in der Membran von Peroxisomen in Hefen angenommen. Porine bilden in Membranen Kanäle aus und erlauben die Diffusion von Metaboliten. Bisher wurden diese 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) identifiziert, nicht aber in peroxisomalen Membranen von Hefezellen. Der peroxisomale Stoffwechsel benötigt aber einen ständigen Fluss von Metaboliten und Ko-Faktoren über die peroxisomale Membran. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Membran für kleine Teilchen durchlässig ist (244). Neuere Studien belegten jedoch die Undurchlässigkeit der Membran der Hefe-Peroxisomen für NAD(H), NADP(H) und Acetyl-CoA *in vivo* (98, 241). Es konnte sogar gezeigt werden, dass die peroxisomale Membran von Säugerzellen für Protonen undurchlässig ist (38). So stellte sich die Frage, ob Metaboliten mit einer geringen molekularen Masse mittels spezifischer Translokatoren oder durch porenformende Proteine die peroxisomale Membran passieren (zur Übersicht:(197)) und ob Pex11p eine Aufgabe bei der Passage übernimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Pex11p einen porinähnlichen Kanal in der Membran von Peroxisomen bildet. Dazu wurden elektrophysiologische Messungen an Membranen durchgeführt. Doch die erfolgten Messungen mit peroxisomalen Fraktionen aus Saccharose-Gradienten (Abb. 3.62) erbrachten sowohl für die erstellten Mutanten, denen die mitochondrialen Porine fehlen (Abb. 3.61), als auch für den Wildtyp kein verwertbares Ergebnis. Aus den gewonnenen Daten konnte nicht auf ein einzelnes Protein als spannungsgesteuerten Kanal geschlossen werden. Die große Menge an verschiedenen Proteinen der untersuchten Fraktionen verursachte wahrscheinlich das Hintergrundrauschen, das stets aufgezeichnet wurde, so dass eine Analyse eines einzelnen Kanals nicht möglich war. Messungen mit stark verdünnte Proteinlösungen führten jedoch ebenso wenig zu einer Identifizierung von Pex11p als Porin.

Als Ursache für das Scheitern der Messungen kann die zeitaufwendige Aufreinigung von Peroxisomen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation angenommen werden. Obwohl mit einem Protease-defizienten Stamm gearbeitet wurde und eine Mixtur aus verschiedenen Protease-Inhibitoren eingesetzt wurde, konnten Proteaseaktivitäten, die eine Veränderungen an der Proteinstruktur des Pex11p hervorrufen könnten, nicht ausgeschlossen werden. Ein kanalbildendes Protein kann durch Proteasen so verändert werden, dass keine funktionelle Pore mehr gebildet werden kann und eine Messung nicht mehr möglich ist (S. Reumann, persönliche Mitteilung). Die Funktion des Pex11p als Porin konnte auf diese Weise nicht untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, Funktionsanalysen an Pex11p vorzunehmen, besteht nur in der schonenden Aufreinigung des nativen Einzelproteins. Dadurch kann eine „Kontamination“ mit Fremdproteinen verhindert werden. Die von Rigaut *et al.* (199) beschriebene Methode der Doppel-Markierung eines Gens mit dem TAP-Tag (Tandem Affinity Purification) erlaubt die effiziente Reinigung eines Proteins unter nativen Bedingungen. Dieser TAP-Tag setzt sich aus einer IgG-bindenden Einheit des Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP) zusammen, die durch eine TEV-Protease-Schnittstelle miteinander verbunden sind (Abb. 2.4). Die Konstruktion ermöglicht die Reinigung geringer Proteinmengen ebenso wie eine Expression des gewünschten Proteins unter natürlichen Bedingungen (199). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit demonstrierte, dass mit Hilfe dieser Methode sogar die Identifizierung von 232 verschiedenen Proteinkomplexen in der Hefe *S. cerevisiae* möglich ist (76).

PEX11 wurde zur weiteren Analyse an seinem C-terminalen Ende mit dem TAP-Tag markiert und die Expression des PEX11-TAP-Tag konnte erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 3.63 und 3.64), so dass eine weitere Aufreinigung und anschließende Funktionsanalyse, die im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vorgenommen werden konnte, erfolgen kann. Die doppelte Reinigungsmethode erlaubt ausreichende Ausbeuten,

so dass sowohl Messungen an künstlichen Membranen als auch an rekonstituierten Liposomen (nach (180)) möglich sind. Elektrophysiologische Messungen ermöglichen nicht nur den Nachweis eines Kanals in einer Membran, sondern können auch Aufschluss über die zu transportierenden Moleküle geben (12, 197). So würde die Detektion des Pex11p als Kanal wesentlich zum Verständnis des Passage von Metaboliten über die Membran von Peroxisomen beitragen.