

Untersuchung der peroxisomalen Membranbiogenese

Dynamik zellulärer Membranen

Arbeit zum Erlangen des akademischen Grades Dr. rer. nat.
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Eingereicht durch:

DIPL. BIOCHEM. INES HEILAND

am 26.8.2004

Verteidigt am 19.11.2004

Betreuer und erster Gutachter:

PROF. DR. RALF ERDMANN

Zweiter Gutachter:

PD DR. WOLFGANG SCHUSTER

Zusammenfassung der Arbeit:

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Standardsekretionsweg in *Saccharomyces cerevisiae* nicht an der Peroxisomenbiogenese beteiligt ist. In *sec*-Mutanten wurde zu keiner Zeit eine ER-Lokalisation des peroxisomalen Membranproteinmarkers Pex3p-EGFP beobachtet. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass einige peroxisomale Membranproteine über das endoplasmatische Reticulum – oder ein spezialisiertes Subkompartiment davon – zum Peroxisomen transportiert werden.

In „frühen“ *pex*-Mutanten wie $\Delta pex3$ und $\Delta pex19$ konnten zudem peroxisomale Membranstrukturen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Strukturen deutlich von Mitochondrien unterscheidbar sind und damit peroxisomale Prästrukturen darstellen könnten.

Desweiteren konnte mit Pex13p ein neuer Interaktionspartner für Pex3p identifiziert werden. Die in früheren Arbeiten identifizierte Interaktion von Pex3p mit Pex19p konnte bestätigt werden. Außerdem wurde die Existenz eines Pex3p-Komplexes mit einer Größe von 1MDa nachgewiesen. Zusätzlich wurde in Vernetzungsexperimenten ein Pex3p-Komplex mit einer Größe von 6 bis 7MDa identifiziert. Ob dieser Komplex auch *in vivo* existiert, konnte nicht geklärt werden.

Abstract:

In the PhD-thesis provided, I have investigated the involvement of the endoplasmic reticulum (ER) in the biogenesis of peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. I have been able to show that the standard secretion pathway is not involved in this process. In the *sec*-mutants investigated the marker protein Pex3p-EGFP has never been located to the ER. However I can not exclude the possibility that another peroxisomal membrane protein is imported into the endoplasmic reticulum or a specialized compartment thereof.

Furthermore, I have proven the existence of peroxisomal membrane structures in the so called „early“ peroxisomal mutants $\Delta pex3$ and $\Delta pex19$ of *S. cerevisiae*. These membrane structures are clearly distinguishable from mitochondria and therefore could be pre-peroxisomal structures.

Additionally, I have identified Pex13p as new interaction partner of Pex3p and confirmed the interaction of Pex3p with Pex19p which has been published before. I have been able to show that Pex3p forms at least a 1MDa complex. Using cross-linking reagent I identified a Pex3p-complex with an approximated size of 6 to 7 MDa. Whether this complex exists *in vivo*, remains to be demonstrated.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
APS	A mmonium p eroxodisulfat
ATP	A denin-Nucleotid- T ri p hosfat
<i>apg</i>	Autophagocytose (alte Mutantenbezeichnung)
<i>atg</i>	Autophagocytose (Mutantenbezeichnung neue Nomenklatur)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>aut</i>	Autophagocytose (alte Mutantenbezeichnung)
bp	B asen p aar
<i>cvt</i>	<i>cytoplasm to vacuole transport</i>
DMSO	D imethylsulfoxid
DsRed	<i>red fluorescent protein</i> aus <i>Discosoma striata</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DTME	D ithio-bis- m aleimidoethan
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	E thylendiamintetraessigsäure (acetic acid)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (mutagenisiertes GFP)
ER	E ndoplasmatisches R eticoulum
<i>fox</i>	<i>fatty acid oxidation</i> (Mutantenbezeichnung)
GDP	G uanin-Nucleotid- D iphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> aus <i>Aequoria victoria</i>
GTP	G uanin-Nucleotid- T ri p hosfat
<i>H. polymorpha</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
IPMP	i ntegrales p eroxisomales M embran p rotein
kb	1000 (K ilo-) B asen p aaire
LiOAc	Lithiumacetat
MCS	m ultiple c loning s ite
MLS	M alatsynthase
mPTS	peroxisomales Membranproteintargetingsignal
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat

NSF	<i>N-ethylmaleimid sensitive fusion protein</i>
OD ₆₀₀	optische D ichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
onu	<i>oleate non utilizer</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>pex</i>	<i>peroxisome biogenesis</i> (Mutantenbezeichnung)
PMP	peroxisomales M embran p rotein
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
PTS	<i>peroxisomal targeting signal</i>
RER	rauhes (<i>rough</i>) endoplasmatisches R etikulum
s.	siehe
S.	Seite
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>synthetic dropout</i> (Medium)
SDS	sodium d odecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SER	glattes (<i>smooth</i>) endoplasmatisches R etikulum
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	SNAP receptor
SRP	<i>signal recognition particle</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure (<i>tri chlor acetic acid</i>)
TEMED	N-,N-,N'-N'-Tetramethylethylendiamin
t-SNARE	<i>target SNARE</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit (Enzymeinheit)
<i>vps</i>	<i>vacuolar protein sorting pathway</i>
v-SNARE	<i>vesicle SNARE</i>
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
YN	<i>yeast nitrogen base</i> (Medium)
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Promotionsarbeiten wurden wie folgt veröffentlicht:

Naturwissenschaftliche Fachzeitschriften

Heiland, I. 2001. Investigation of peroxisomal membrane biogenesis. B.I.F.Futura **16**:176-177

Heiland, I. and R. Erdmann. Peroxisome biogenesis does not share components with autophagocytosis. (In Vorbereitung).

Heiland, I. and R. Erdmann. The standard secretion pathway is not involved in peroxisomal membrane biogenesis. (In Vorbereitung).

Heiland, I., New routes into the endoplasmic reticulum. B.I.F.Futura (In Vorbereitung).

Vorträge

Sept. 2001 EMBO Course on Electron Microscopy, Heidelberg

Okt. 2002 B.I.F.-Sommerseminar, Hirschegg

Sept. 2003 B.I.F.-Sommerseminar, Hirschegg

Sept. 2003 Universität Heidelberg, AG Dobberstein

März 2004 Biological School of Science, Manchester University

Posterpräsentationen

Nov. 2001: Tag der Chemie, Berlin

Nov. 2001: First German and French Joint Meeting on Molecular Cell Biology, Strassbourg

Dec. 2001: 42. American Society for Cell Biology Meeting, Washington D.C.

Nov. 2002: EMBO-Seminar on Membranes and Compartments, Heidelberg

Dipl. Biochem. Ines Heiland

Dez. 2002: 2. International Meeting on Protein and Membrane Transport in the Secretory Pathway, Göttingen

Mai 2003: Meeting on Peroxisome Biogenesis and Function, Groningen