

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Mutantenuntersuchung

Auf der Suche nach der Herkunft peroxisomaler Membranen wurden in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl von Mutanten untersucht. So wurde die Frage gestellt, ob das endoplasmatische Reticulum am Import und Transport peroxisomaler Membranproteinen beteiligt ist. Desweiteren wurden alternative Membranproteinimportkomponenten wie YidC-Homologe erforscht. Als alternativer Membranursprung und als Weg mit mechanistischen Parallelen zur Peroxisomenbiogenese wurde außerdem die Autophagocytose auf eine mögliche Überlappung mit der Peroxisomenbiogenese untersucht.

Da in *Saccharomyces cerevisiae* bisher kein Orthologes zu dem im Menschen für die peroxisomale Membranbiogenese essentiellen Peroxin Pex16p identifiziert werden konnte, wurden in der vorliegenden Arbeit Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu Yl<sup>1</sup>Pex16p auf eine Beteiligung an der Peroxisomenbiogenese untersucht.

### 4.1.1 *sec*-Mutanten

Die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums (ER) an der Peroxisomenbiogenese ist umstritten. Die Untersuchungen dieser Fragestellung in den letzten Jahren erbrachten scheinbar widersprüchliche Ergebnisse [142, 143, 158, 153, 101, 27, 56]. In den bisherigen Forschungsarbeiten wurden jedoch voneinander unterschiedliche Methoden für die Untersuchung in verschiedenen Organismen angewendet. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Methoden für die Untersuchung der ER-Beteiligung an der Peroxisomenbiogenese in einem Organismus angewendet. *S. cerevisiae* ist hierfür ein idealer Modellorganismus, da eine Vielzahl biochemisch und zellbiologisch gut charakterisierter Sekretionsmutanten zur Verfügung stehen und Transformanten leicht herstellbar sind.

Für die Untersuchung der Beteiligung des ER an der Peroxisomenbiogenese wurden Sekretionsmutanten so ausgewählt, dass jeder Schritt des Standardsekretionsweges blockierbar ist (s. Abb. 1.1, S. 6) und so die verschiedenen Schritte

---

<sup>1</sup>*Yarrowia lipolytica*

des Proteinimports in das ER und des Transports über ER und Golgi-Apparat untersucht werden konnten.

### Fluoreszenzmarker für die peroxisomalen Membranbiogenese

In *Yarrowia lipolytica* konnte eine transiente ER-Lokalisation von neusynthetisierten Peroxinen in Sekretionsmutanten gezeigt werden [153]. Um die Ergebnisse aus *Y. lipolytica* zu reproduzieren, sollte zu Beginn der Arbeiten versucht werden, eine ER-Lokalisation eines peroxisomalen Membranproteins in Sekretionsmutanten aus *S. cerevisiae* nachzuweisen. Außerdem sollte die in der vorgenannten Arbeit beobachtete Misslokalisierung peroxisomaler Matrixproteine in *sec*-Mutanten für *S. cerevisiae* mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden reproduziert werden.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung musste ein Reporterkonstrukt für das *targeting* von Membranproteinen erstellt werden. Pex3p ist auf Grund seiner Funktion in der „frühen“ Peroxisomenbiogenese das beste Markerprotein für eine mögliche ER-Lokalisation peroxisomaler Membranproteine. Außerdem besitzt Pex3p ein ER-Targetingsignal [7]; die Funktionalität dieser Signalsequenz konnte im endogenen Protein jedoch nicht bewiesen werden.

Da der N-Terminus sowohl das mögliche ER-Targetingsignal als auch die peroxisomale Signalsequenz enthält [83], wurde Pex3p C-terminal mit EGFP fusioniert (pIH643 [54]). Um Artefakte durch die Überexpression des Proteins zu vermeiden, wurden der Bereich -400 bis -1 aus dem Promotorbereich des endogenen Pex3p als Promotor vor das Fusionskonstrukt kloniert. Außerdem wurde ein *single copy plasmid* verwendet. Wie Abbildung 4.1 A anhand eines Gesamtzellaufschlusses (Methode s. Abschn. 3.2.5, S. 37) zeigt, entspricht die Expressionstärke des Fusionskonstruktes der des endogenen Proteins.

Die Fusion eines Proteins mit EGFP oder anderen Markern kann die Funktion des Proteins beeinflussen. Deshalb wurde zu Beginn der Arbeit die Funktionalität des Fusionskonstruktes überprüft. Hierfür wurde das Konstrukt in eine  $\Delta pex3$  Mutante transformiert und die Komplementation des *pex*-Phänotyps untersucht. Dafür stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

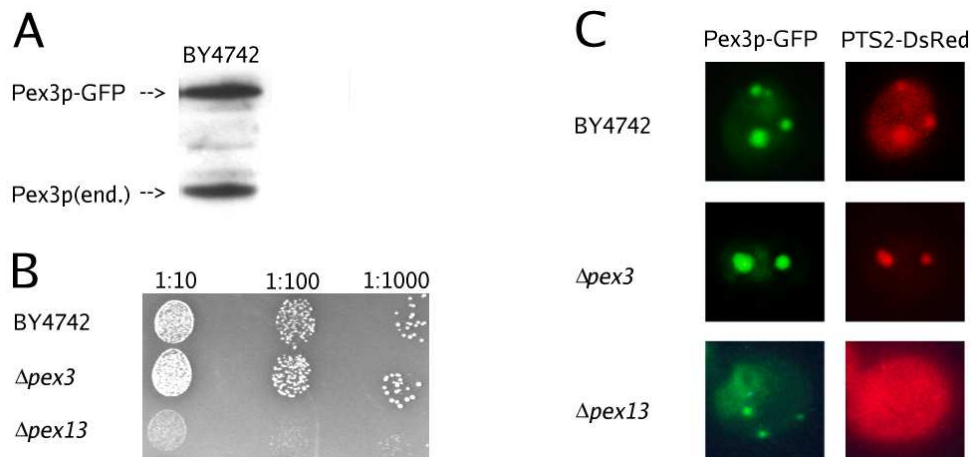
Da nur Zellen mit funktioneller Peroxisomenbiogenese auf Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle wachsen können, wurde das Wachstum der Transformanten auf Ölsäure enthaltenden Minimalmedien getestet. *pex*-Mutanten können auf diesen Medien nur sehr geringfügig wachsen und sind nicht in der Lage, die im Medium

enthaltene Ölsäure zu verwerten. Wird in diesen Mutanten die Peroxisomenbiogenese durch Einbringen des Fusionskonstruktes wiederhergestellt, können diese Zellen wieder Ölsäure abbauen. Durch die Aufnahme der Ölsäure werden die sonst trüben Platten im Umfeld der Klone klar (Hofbildung). Zur Kontrolle wird auch das Wachstum der Zellen auf SD-(0,3% Glucose)- und Ethanolmedien untersucht. Peroxisomale Mutanten besitzen keinen Wachstumsdefekt auf SD- oder Ethanolmedium. Mitochondriale Mutanten wachsen hingegen auf SD-Medium, nicht aber auf Ethanol- oder Ölsäuremedien, da hierfür ein funktioneller aerober Stoffwechsel notwendig ist. Mutanten mit Wachstumsdefekten auf SD-Medium weisen meist eine schwerwiegende Störung mehrerer zellulärer Prozesse auf.

Eine weitere Methode ist die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation peroxisomaler Matrixproteinmarker. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür PTS2-DsRed (pIH972, s. Abschn. 3.1.5, S. 3.1.5) und EGFP-PTS1 (YEp352/EGFP-PTS1 [90]) verwendet. Ist die Peroxisomenbiogenese gestört, werden peroxisomale Matrixproteine in das Cytosol misslokalisiert. Die Zellen zeigen eine cytosolisch diffuse Fluoreszenz. Kann die Peroxisomenbiogenese wieder hergestellt werden, ist eine punktierte Färbung der Zellen zu beobachten. Die Lokalisation von peroxisomalen Matrixproteinen kann außerdem über subzelluläre Fraktionierung bestimmt werden, siehe hierzu Abschnitt 4.1.1 auf Seite 62.

In Abbildung 4.1 ist das Ergebnis der Funktionsanalyse des Pex3p-EGFP-Fusionsproteins dargestellt: Wurde eine  $\Delta pex3$ -Mutante mit dem Pex3p-EGFP-Fusionsprotein transformiert, konnten die Zellen wieder auf Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen (Abb. 4.1 B). Der Defekt der Peroxisomenbiogenese konnte somit komplementiert werden. Die Mutante  $\Delta pex13$  diente als Negativkontrolle für diesen Wachstumstest auf Ölsäure (s. Abschn. 3.2.6, S. 38).  $\Delta pex13$ -Zellen können nicht auf Medien mit Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle wachsen (Abb. 4.1 B). Der zu den Mutanten korrespondierende Wildtypstamm BY4742 diente als Positivkontrolle.

Im Fluoreszenzmikroskop wurde eine punktierte Färbung durch Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed beobachtet (Durchführung s. Abschn. 3.3.3, S. 45). Die punktierte Färbung des Matrixproteins zeigte, dass der Import der peroxisomalen Matrixproteine wiederhergestellt werden konnte – ein weiterer Beweis für die Funktionalität von Pex3p-EGFP. Außerdem kolokalisierte das Matrixprotein PTS2-DsRed mit Pex3p-EGFP. Das bedeutet, dass auch die Zielsteuerung von Pex3p-

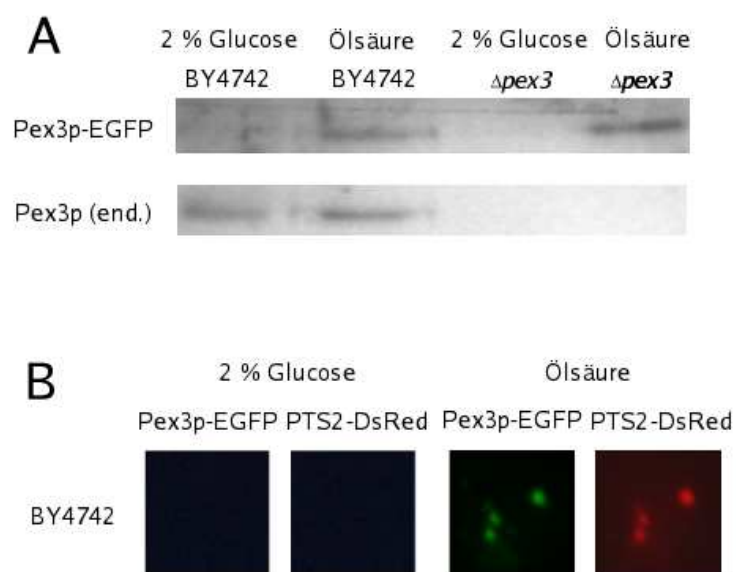


**Abbildung 4.1: Expression von Pex3p-EGFP und Funktionalitätstest:** Pex3p-EGFP exprimierende BY4742-Mutanten wurden wie folgt analysiert: (A) Gesamtzellaufschluss des Wildtypstamms. Der Immunoblot wurde mit Antikörpern gegen Pex3p inkubiert (B) Die Zellen ( $OD_{600}=1$ ) wurden 1:10, 1:100, 1:1000 verdünnt und auf Ölsäureplatten 6 Tage bei 30°C inkubiert (C) Fluoreszenzaufnahmen von einzelnen Zellen. Die gezeigten Stämme exprimieren PTS2-DsRed und Pex3p-EGFP.

EGFP funktioniert und das Protein peroxisomal lokalisiert ist.

Als Kontrolle wurde Pex3p-EGFP in einer  $\Delta pex13$ -Mutante exprimiert. Dabei ist nicht zu erwarten, dass die Peroxisomenbiogenese wiederhergestellt werden kann. Es wäre jedoch möglich, dass Pex3p-EGFP aggregiert und eine Aggregation des PTS2-DsRed verursacht [54]. Auch in diesem Fall wäre eine punktierte Fluoreszenzfärbung in Wildtyp- und  $\Delta pex3$ -Zellen zu beobachten. Diese müsste dann jedoch auch für PTS2-DsRed in  $\Delta pex13$  zu beobachten sein. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass Pex3p-EGFP funktionell ist.

Für die Untersuchung des Importweges von neusynthetisiertem Proteinen war es wichtig, Bedingungen zu finden, unter denen die Reporterstrukture nicht exprimiert sind. Wie Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite zeigt, sind sowohl Pex3p-EGFP als auch PTS2-DsRed auf Medien mit einem Glucosegehalt von 2% nicht exprimiert. Nach 24 Stunden Wachstum auf ölsäurehaltigem Medium sind beide Konstrukte induziert und im Wildtyp peroxisomal lokalisiert. Endogenes Pex3p (Abb. 4.2A) und EGFP-PTS1 (nicht gezeigt) sind nicht vollständig Glucose reprimiert aber auch Ölsäure induzierbar. Die Verwendung von nur 400bp aus dem Promotor des endogenen Pex3p beeinflusst demnach die Expression auf Glucose jedoch nicht die Expressionsstärke auf Ölsäure.



**Abbildung 4.2: Expressionsverhalten der Reporterkonstrukte:** BY4742- $\Delta pex3$  und -wildtyp wurden auf SD-Festmedium mit 2% Glucose angezogen und für 16 Stunden in den angegebenen Medien induziert. (A) Immunoblots von Gesamtzell-aufschlüssen, inkubiert mit Antikörper gegen Pex3p. (B) Fluoreszenzaufnahmen von mit Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed transformierten Einzelzellen. end. = endogen

### Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *sec*-Mutanten

Die Reporterkonstrukte *PEX3-EGFP*, *PTS2-DsRed* und *EGFP-PTS1* wurden in die vorhandenen Sekretionsmutanten transformiert und die Zellen bei permissiver Temperatur (23°C) unter nicht-induzierenden Bedingungen (Glucosegehalt 2%) angezogen. Danach wurden die Zellen 3 Stunden (s. 3.3.1, S. 45) bei nicht-permissive Temperatur (37°C) inkubiert und anschließend für maximal 24 Stunden auf ölsäurehaltigen Platten bei 37°C induziert. Als Kontrolle wurden die Transformanten ohne Temperaturshift bei permissiver Temperatur (23°C) induziert (nicht gezeigt). Die subzelluläre Lokalisation der Markerproteine wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Abb. 4.3 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen der Sekretionsmutanten bei nicht-permissiver Temperatur. Alle Reporterkonstrukte sind peroxisomal lokalisiert. Keines der Proteine zeigt zu irgendeinem Zeitpunkt während der Induktion eine ER-Lokalisation.

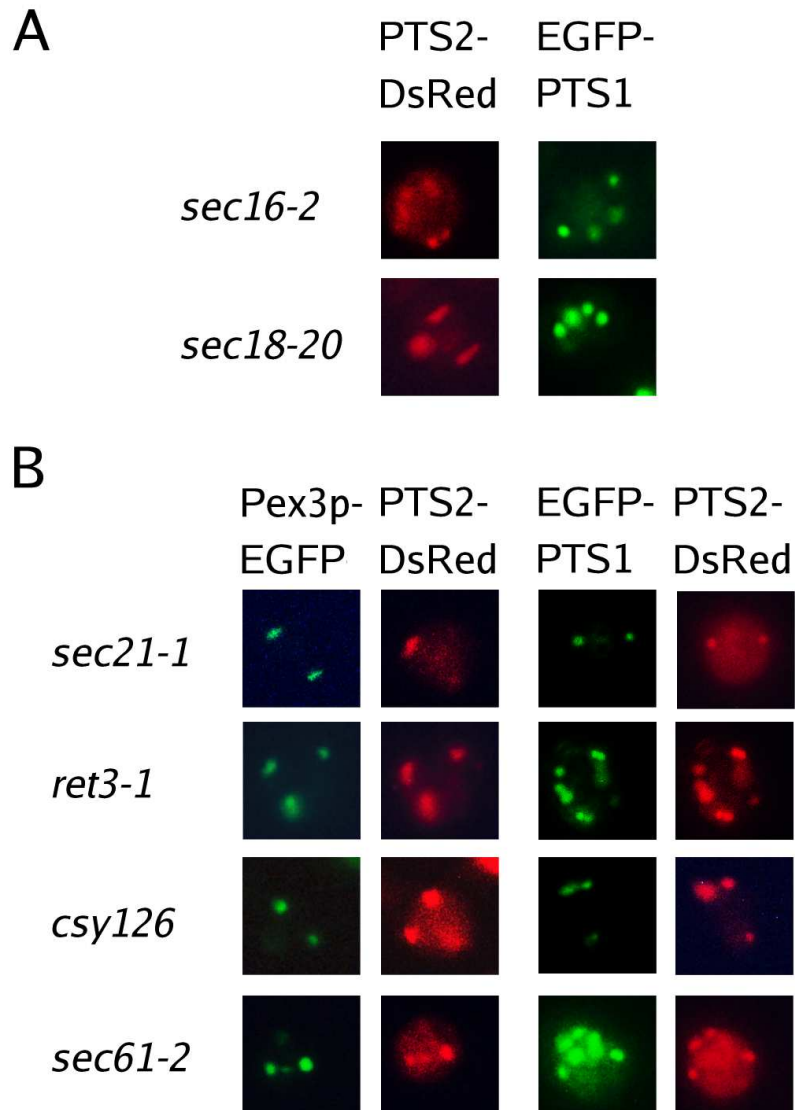
In *sec23-1*, *ret2-1* und *sec61-2/Δssh1*-Mutanten waren die fluoreszenten Markerproteine auch auf permissiver Temperatur weder im Immunoblot noch mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops detektierbar. Die Peroxisomenbiogenese konnte daher in diesen Mutanten mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden nicht untersucht werden.

In *sec16-2* und *sec18-20*-Mutanten stand jeweils nur *LEU2* als Standardselektionsmarker zur Verfügung, daher konnten keine Doppeltransformanten untersucht werden. Außerdem wurde für die Untersuchung der Lokalisation des EGFP-PTS1 in diesen Mutanten das Plasmid pIH217 [54] verwendet.

Da *sec16-2* und *sec18-20*-Mutanten keinen Defekt (s. Abb. 4.3 auf der nächsten Seite) und keine Verzögerung in der Peroxisomenbiogenese aufwiesen, wurde auf eine Umklonierung des Pex3p-EGFP in einen anderen Vektor verzichtet. Die Pex3p-EGFP-Lokalisation konnte deshalb in diesen Mutanten nicht untersucht werden.

### Subzelluläre Fraktionierung

Mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden konnte keine Beteiligung des ER an der Peroxisomenbiogenese in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Auch eine Misslokalisierung von peroxisomalen Matrixproteinen in Sekretionsmutanten konnte mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden nicht gezeigt werden. Die Untersuchung von drei Mutanten war jedoch mit dieser Methode nicht möglich. Desweiteren



**Abbildung 4.3: Fluoreszenzaufnahmen *sec*-Mutanten:** (A) Einzellaufnahmen von *sec16-2*- und *sec18-20*-Mutanten, die entweder PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 exprimieren. Die gezeigten Zellen wurden bei nicht-permissiver Temperatur (37°C) induziert. (B) Einzellaufnahmen von Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed exprimierenden *sec*-Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur (37°C).

wurde die Misslokalisierung von peroxisomalen Matrixproteinen in *Y. lipolytica* mit biochemischen Methoden nachgewiesen [153]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die subzelluläre Lokalisation peroxisomaler Proteine in Zellysaten aus *S. cerevisiae* biochemisch untersucht.

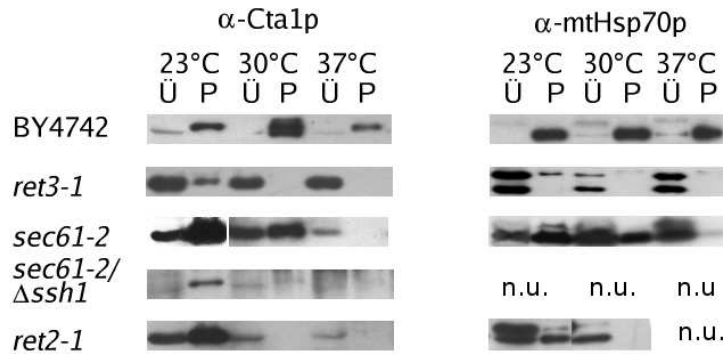
Bei der subzellulären Fraktionierung werden die verschiedenen Zellkomponenten durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt. Im ersten Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 300g) werden Zelltrümmer und Zellkerne aus dem Zellysate abzentrifugiert. Im zweiten Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 25.000g) werden die Zellorganellen von cytosolischen Proteinen und kleinen vesikulären Strukturen getrennt. Deshalb wird das Pellet der Zentrifugation auch als Organellenpellet bezeichnet.

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden die Mutanten *ret2-1*, *ret3-1*, *sec23-1*, *sec61-2* und *sec61-2/Δssh1* bei unterschiedlichen Temperaturen (23°C, 30°C und 37°C) induziert und nach Spheroplastierung lysiert. Der hieraus präparierte PNS wurde bei 25.000g zentrifugiert, um die Organellen vom Cytosol zu trennen. Gleiche Teile von Pellet und Überstand wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und der resultierende Westernblot mit Antikörpern gegen das peroxisomale Matrixprotein Katalase (Cta1p) inkubiert (Durchführung s. Abschn. 3.3.4, S. 46). Als Kontrollprotein diente mitochondriales Hsp70 (mtHsp70) (s. Abb. 4.4). Da zu den Sekretionsmutanten kein isogener Wildtyp zur Verfügung stand, wurde BY4742 als Kontrolle mitgeführt.

Die Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite zeigt deutlich, dass in den untersuchten Sekretionsmutanten die peroxisomale Katalase temperaturabhängig misslokalisiert ist. Diese Misslokalisierung korreliert mit der Misslokalisierung des mitochondrialen Matrixproteins mtHsp70p. In der Mutante *sec61-2/Δssh1* ist die Katalase bei höheren Temperaturen nicht mehr detektierbar. In *sec23-2*-Zellen konnte unabhängig von der Temperatur keine Katalase detektiert werden (nicht gezeigt).

Im Cytosol neusynthetisiertes mtHsp70p (prä-mtHsp70) enthält die mitochondriale Signalsequenz. Diese wird nach dem Import abgespalten, wodurch reifes mtHsp70p entsteht. Die beiden Formen können in SDS-Gel getrennt werden. In Abbildung 4.4 ist dadurch erkennbar, dass der Import von mtHsp70 in die Mitochondrien reduziert ist, dass aber zusätzlich bereits importiertes reifes mtHsp70 (untere Bande) wieder in das Cytosol freigesetzt wird. Da peroxisomale





**Abbildung 4.4: Subzelluläre Lokalisation von Cta1p und Hsp70p:** Die Zellen wurden in ölsäurehaltigem YN-Medium bei den angegebenen Temperaturen für 14 bis 16 Stunden induziert. Von Pellet und Überstand einer 25.000g Zentrifugation wurden gleiche Anteile auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Proteinmengen unterschiedlicher Anzuchten sind hingegen nicht vergleichbar. Die resultierenden Blots wurden mit anti-Cta1p (peroxisomale Katalase) und anti-mtHsp70p (mitochondriales Hsp70p) Antikörpern inkubiert (obere Bande – prä-mtHsp70p, untere Bande – reifes mtHsp70p) n.U.=nicht untersucht

Proteine in *S. cerevisiae* nicht prozessiert werden [92], ist eine solche Unterscheidung für peroxisomale Proteine nicht möglich. Die Freisetzung bereits importierter Proteine könnte während der Probenaufarbeitung erfolgt sein und auf eine veränderte Membranstabilität der Organellen in den Sekretionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp hinweisen. In jedem Fall ist die beobachtet Misslokalisierung nicht spezifisch für peroxisomale Proteine und somit ein pleiotroper Effekt.

### Elektronenmikroskopie

Da mit Hilfe der bisher beschriebenen Methoden (Fluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung) keine Aussage über Defekte der Peroxisomenbiogenese in den Mutanten *sec23-1*, *ret2-1* und *sec61-2/ $\Delta$ ssh1* getroffen werden konnte, sollte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie geklärt werden, ob in diesen Mutanten Peroxisomen vorhanden sind (Durchführung s. Abschn. 3.3.5, S. 47).

Peroxisomen erscheinen im Elektronenmikroskop als elektronendichte Strukturen die von einer Membran umgeben sind. Sie haben in *S. cerevisiae* eine Größe von 0,5 bis 1  $\mu$ m. Im Gegensatz dazu sind Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben. Die innere Mitochondrienmembran bildet Membraneinfaltungen.

Diese als Cristae bezeichneten Strukturen sind im elektronenmikroskopischen Bild deutlich erkennbar. Die Vakuole der Hefe ist von einer Einzelmembran umgeben. Die Größe der Vakuole und ihre Elektronendichte variiert abhängig vom Stamm und den Wachstumsbedingungen. Häufig sind Ausstülpungen der vakuolären Membran zu beobachten, diese sind typisch für die Mikroautophagocytose (s. Abschn. 1.3, S. 7). Bei der Makroautophagocytose werden hingegen Organellen und Cytosol von einer Doppelmembran umschlossen, die nicht mit der Vakuole verbunden ist [80].

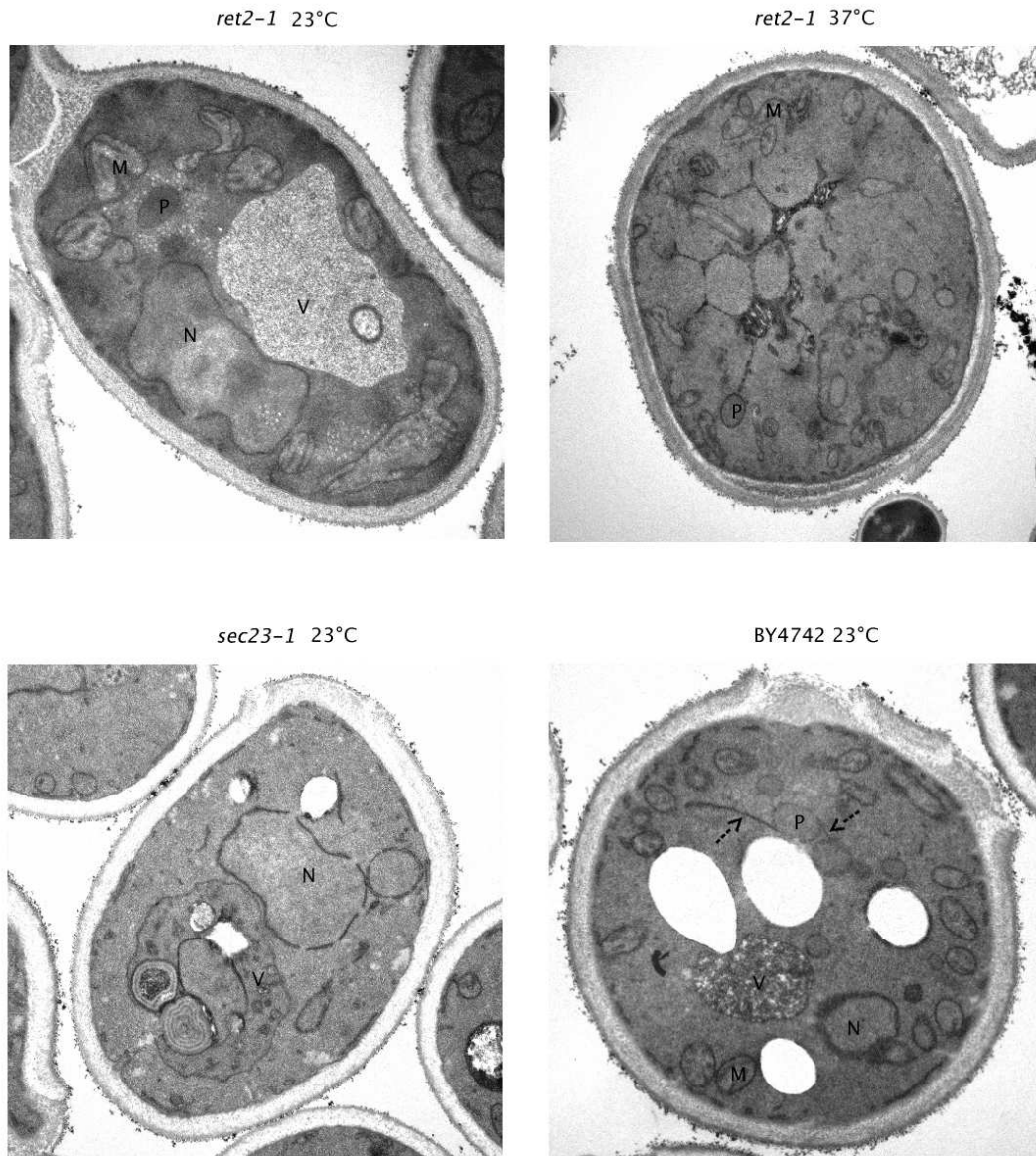
In der Doppelmutante *sec61-2/Δshh1* konnten bei nicht-permissiver Temperatur (37°C) keine für Peroxisomen typische Strukturen detektiert werden (nicht gezeigt). Da in dieser Mutante bei nicht-permissiver Temperatur keine peroxisomalen Matrixproteine im Westernblot detektiert werden konnten, war dies zu erwarten.

In *sec23-1* Zellen konnten auch bei permissiver Temperatur nur Zellkerne und Vakuolen detektiert werden (s. Abb. 4.5 auf der nächsten Seite). Die Zellen enthalten keine typischen mitochondrialen und peroxisomalen Strukturen.

In *ret2-1*-Zellen sind Peroxisomen bei permissiver und bei nicht-permissiver Temperatur detektierbar. Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen die Peroxisomen in *ret2-1*-Mutanten bei permissiver Temperatur (23°C) teilweise von einer kristallinen Matrix umgeben. Bei nicht permissiver Temperatur sind in einigen Zellen Peroxisomen detektierbar, deren Membran in eine ER-artige Struktur übergeht. In Abbildung 4.5 auf der nächsten Seite geht diese Membranstruktur scheinbar in eine vakuoläre Struktur über. Die abgebildete Struktur ist jedoch untypisch für Mikro- oder Makroautophagocytose. Auch in Wildtypzellen (siehe Abbildung 4.5, links unten) sind gelegentlich Verbindungen von ER-artigen Strukturen mit Peroxisomen zu erkennen, wie sie vor kurzem für dendritische Mauszellen beschrieben wurden [40, 151].

### 4.1.2 ER-Mutanten

Neben den essentiellen Proteinen des Standardsekretionsweges (s. Abb. 1.1, S. 6) sind auch einige nichtessentielle Proteine, wie Ssh1p, Sbh1p und Sbh2p, am Proteinimport in das endoplasmatische Reticulum beteiligt (s. Abschn. 1.2.2, S. 4). Außerdem wurde dem ADP-Ribosylierungsfaktor Arf3p eine mögliche Beteiligung an der Peroxisomenbiogenese zugeschrieben [128].



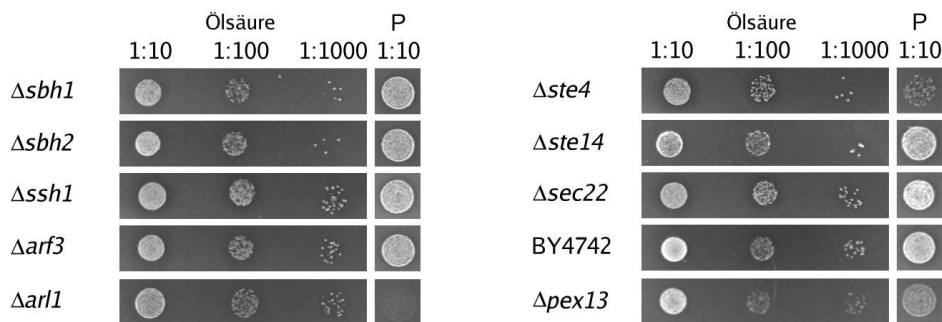
**Abbildung 4.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen *ret2-1* und *sec23-1*:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von auf Ölsäure bei den angegebenen Temperaturen angezogenen Zellen. Die Pfeile in der Wildtypzelle weisen auf ER-artige Strukturen hin, die mit der peroxisomalen Membran verbunden sind. (P-Peroxisomen, M-Mitochondrien, N-Zellkern, V-Vakuole; Vergrößerung 1:30000)

Ste-Proteine sind an der Reifung der Matingfaktoren der Hefe beteiligt und im endoplasmatischen Reticulum und der Plasmamembran lokalisiert. Für Ste4p wurde eine Interaktion mit dem Autophagocytoseprotein Atg16p nachgewiesen [64]. Ste14p interagiert im Split-Ubiquitin-System mit Pex3p [24].

Zusätzlich zu den Sekretionsmutanten wurden deshalb einige Deletionsmutanten von diesen nichtessentiellen ER-Proteinen untersucht. Neben der Untersuchung der Fluoreszenzmikroskopischen Lokalisation der peroxisomalen Reporterkonstrukte Pex3p-EGFP, PTS2-DsRed und EGFP-PTS1 (s. Abschn. 3.3.3, S. 45), wurde bei diesen Mutanten das Wachstum auf Ölsäure und Petrosilinsäure als alleinige Kohlenstoffquellen untersucht (Methode s. Abschn. 3.2.6, S. 38). Der Wachstumstest auf Petrosilinsäure ist sensitiver als der Wachstumstest auf Ölsäuremedien. So wachsen  $\Delta pex11$ -Mutanten auf ölsäurehaltigem Medium, nicht aber auf Petrosilinsäure- oder Laurinsäuremedium [125].

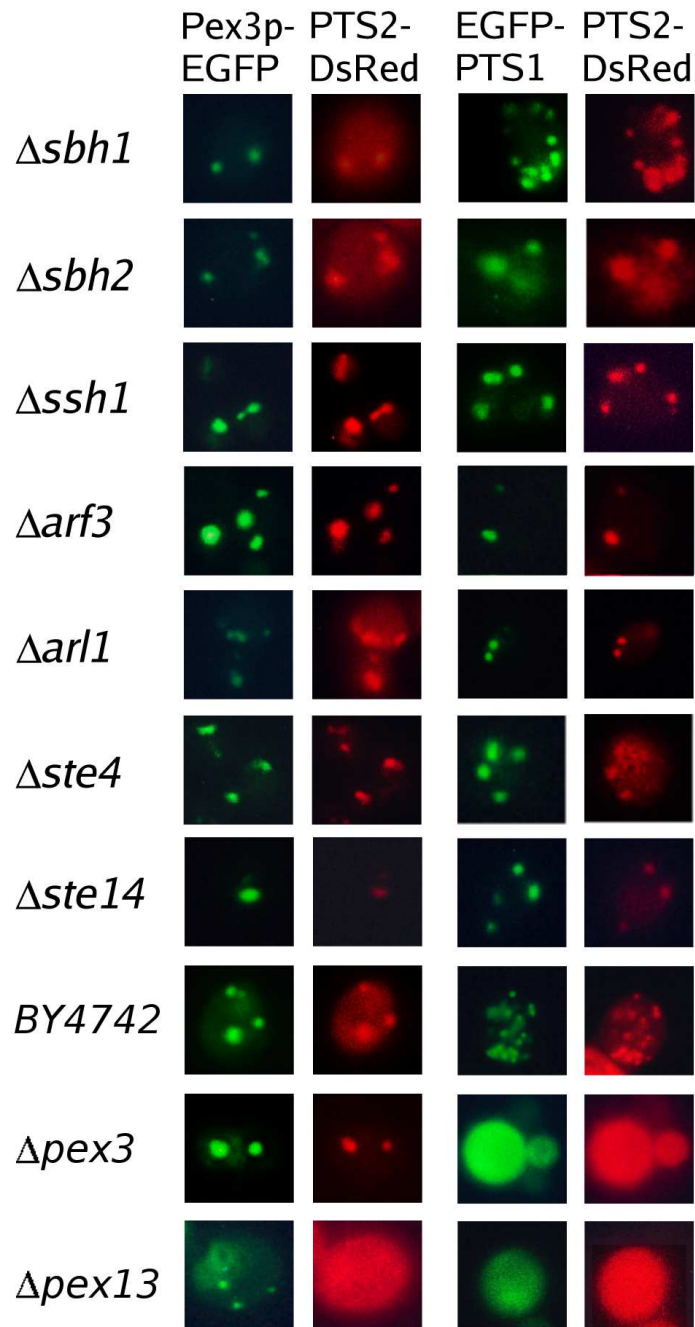
Die subzelluläre Lokalisation der peroxisomalen Katalase wurde in den ER-Mutanten durch Aktivitätsmessungen bestimmt (Durchführung siehe Abschnitt 3.3.4 auf Seite 46 und Abschnitt 3.4.4 auf Seite 49).

Wie in Abbildung 4.6 erkennbar ist, zeigt keine der untersuchten Deletionsmutanten einen Wachstumsdefekt auf Ölsäuremedium.  $\Delta arl1$  und  $\Delta ste4$  zeigten jedoch einen Wachstumsdefekt auf Petrosilinsäure als alleinige Kohlenstoffquelle.



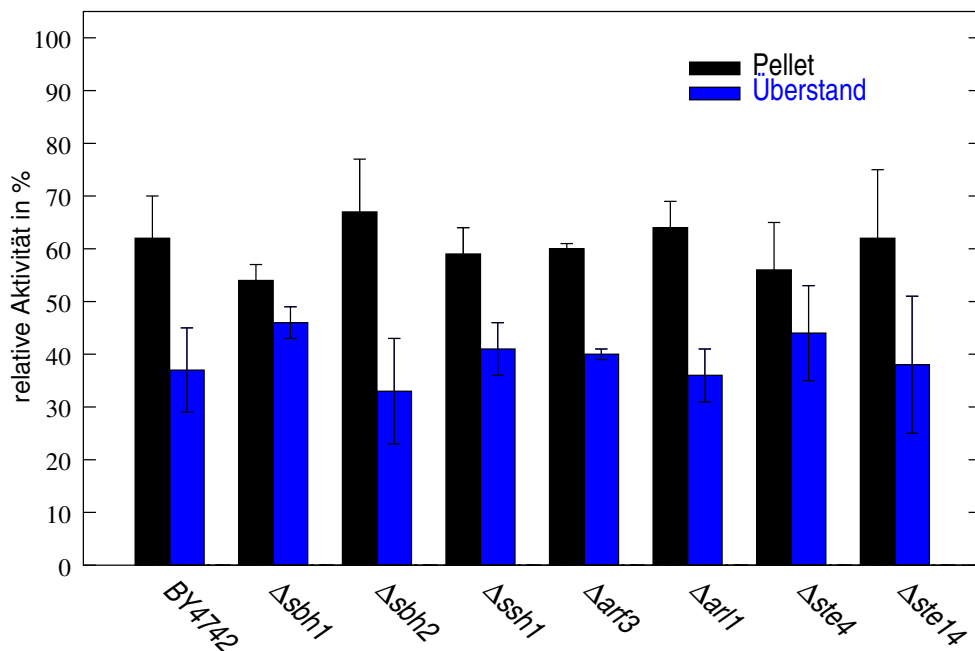
**Abbildung 4.6: Wachstum auf Ölsäure – ER-Mutanten:** Eine Zellsuspension mit einer  $OD_{600}$  von 1 wurde 1:10, 1:100, 1:1000 verdünnt und je  $2\mu l$  auf Ölsäuremedium und Petrosilinsäuremedium aufgetragen und die Zellen bei  $30^{\circ}C$  für 6 Tage inkubiert. (P-Petrosilinsäure)

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Mutanten (siehe Abbildung 4.7 auf der nächsten Seite) ist zu erkennen, dass alle Reporterkonstrukte eine peroxisomale Lokalisation aufwiesen.



**Abbildung 4.7: Fluoreszenzaufnahmen ER-Mutanten:** Die Mutanten exprimierten entweder Pex3p-GFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed und wurden nach dreitägiger Anzucht auf selektivem SD-Medium (0,3% Glucose) für 24 Stunden auf nichtselektiven Ölsäureplatten induziert. Gezeigt sind Aufnahmen einzelner Zellen.

Auch die biochemische Untersuchung der subzellulären Lokalisation der peroxisomalen Katalase durch Messung der Enzymaktivität ergab keinen Hinweis auf einen Defekt der Peroxisomenbiogenese in den untersuchten Mutanten. Da in allen Mutanten die Katalaseaktivität im Organellenpellet höher war als die Aktivität im cytosolischen Überstand. Der im Vergleich zur Westernblotanalyse höhere Anteil der Katalaseaktivität im Überstand (vergleiche Wildtyp Abb. 4.4, S. 65) ist auf die Aktivität einer cytosolischen Katalase zurückzuführen. Die Aktivität der cytosolischen Katalase ist wesentlich geringer als die der peroxisomalen Katalase, da dieses Enzym *in vivo* eine andere Reaktion katalysiert als die peroxisomale Katalase und somit eine geringere Affinität zum verwendeten Substrat besitzt. Deshalb kann der Reaktionsansatz für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von peroxisomaler Katalase herangezogen werden. Eine Untersuchung von partiellen Misslokalisationen ist aus vorgenannten Gründen mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Die zu beobachtenden Schwankungen der Katalaseaktivität im Organellenpellet sind demnach zu vernachlässigen.



**Abbildung 4.8: Subzelluläre Fraktionierung ER-Mutanten:** Die Abbildung zeigt die relativen Katalaseaktivitäten in vergleichbaren Mengen von Organellenpellet und cytosolischem Überstand (Zentrifugation des PNS bei 25.000g für 10 Minuten). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n=4).

### 4.1.3 YidC-Homologe

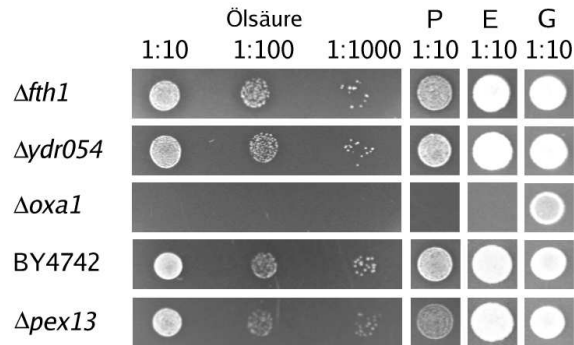
YidC ist in Bakterien ein sec-unabhängiges Translokon in der Plasmamembran. Auf Grund der Funktion von YidCp in Bakterien wäre es möglich das YidC-Homologe an einem sec-unabhängigen Import von Membranproteinen in das ER oder an einem ER-unabhängigen Membranproteintransport beteiligt sind. Auf der Suche nach dem Ursprung peroxisomaler Membranen und dem Importweg für „frühe“ Peroxine wurden deshalb auch YidC-Homologie-Mutanten untersucht.

In der Hefe *S. cerevisiae* konnten unter Verwendung der *Blosum62* Matrix vier Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu YidCp identifiziert werden – Oxa1p, Fth1p, Aur1p und Ydr540cp. Oxa1p ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran und für die Insertion von Membranproteinen aus der mitochondrialen Matrix in die innere Mitochondrienmembran verantwortlich [55]. Fth1p wurde als vakuoläres Protein [58] und Eisentransporter [155] beschrieben. Aur1p ist am Sphingolipidmetabolismus beteiligt und im Golgi-Apparat lokalisiert [94]. Da  $\Delta aur1$ -Mutanten nicht lebensfähig sind, konnte die Beteiligung von Aur1p an der Peroxisomenbiogenese in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Ydr540cp wurde bisher nicht charakterisiert. Die zugehörigen Mutanten wurden mit den schon beschriebenen Methoden (Wachstumstest und Fluoreszenzmikroskopie) auf einen Defekt in der Peroxisomenbiogenese untersucht.

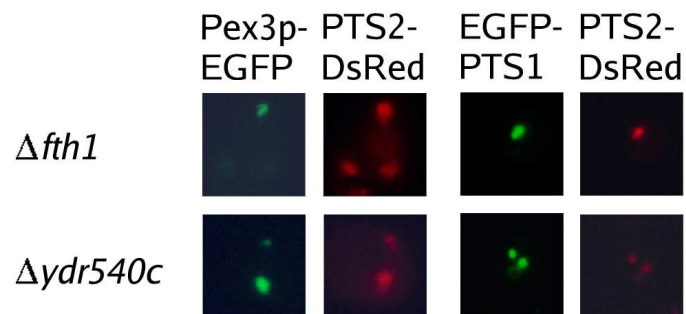
Die Mutanten  $\Delta fth1$  und  $\Delta ydr540c$  waren in der Lage auf Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen (Abb. 4.9). Beide Mutanten wiesen zudem eine peroxisomale Lokalisation der fluoreszenten Reporterkonstrukte auf (Abb. 4.10). Es konnte somit kein Hinweis auf eine Beteiligung von Fth1p oder Ydr540cp an der Peroxisomenbiogenese gefunden werden.

$\Delta oxa1$ -Mutantenzellen zeigten einen generellen Wachstumsdefekt. Sie waren nicht in der Lage, auf Ethanol-, Ölsäure- und Petrosilinsäuremedium zu wachsen und wiesen ein reduziertes Wachstum auf SD-Medium mit 0,3% Glucose auf. Dies war auf Grund der Funktion von Oxa1p in der Mitochondrienbiogenese jedoch zu erwarten. Die eingesetzten peroxisomalen Reporterkonstrukte konnten in  $\Delta oxa1$  mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht detektiert werden.





**Abbildung 4.9: Wachstum auf Ölsäure:** Eine Zellsuspension mit einer  $OD_{600}$  von 1 wurde 1:10, 1:100, 1:1000 verdünnt und je  $2\mu\text{l}$  auf die verschiedenen Festmedien aufgetropft. Die Zellen wurden dann für 3 (SD-Medium), 5 (Ethanolmedium) oder 6 Tage (Ölsäuremedium und Petrosilinsäuremedium) bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. (P- Petrosilinsäure, E-Ethanol, G-SD-Medium mit 0,3% Glucose)



**Abbildung 4.10: Fluoreszenzaufnahmen Yidc Homologie-Mutanten:** Einzelaufnahmen von ölsäureinduzierten Mutanten, die entweder Pex3p-GFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed exprimieren.



### 4.1.4 Autophagocytosemutanten

Die Autophagocytose weist einige mechanistische Parallelen zur Peroxisomenbiogenese auf. Dazu gehören essentielle ubiquitinkonjugierende Systeme und der Import gefalteter Proteine (s. Abschnitt 2, S. 25). Außerdem bildet sich die prä-autophagosomale Membranstruktur unabhängig vom Standardsekretionsweg (s. Abschn. 1.3.6, S. 14). Es ist daher vorstellbar, dass Peroxisomen und Autophagosom den selben Membranursprung haben. Aus diesen Gründen wurden alle zum Zeitpunkt der Untersuchung bekannten *atg*- und *cvt*-Mutanten auf einen Defekt in der Peroxisomenbiogenese untersucht.

Auch für die Untersuchung der Autophagocytosemutanten wurden die bereits beschriebenen Methoden (Wachstumstest, Fluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung, siehe auch Abschn. 4.1.2, S. 66) angewandt. In diesem Abschnitt sind nur die Ergebnisse der Untersuchungen einer Auswahl von *atg*- und *cvt*-Mutanten dargestellt. Für eine bessere Übersicht wurden dabei bevorzugt die *atg*-Bezeichnungen verwendet, auch wenn dies nicht der offizielle Name der Mutante ist. Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite listet alle bisher bekannten für den Autophagocytoseweg oder den *cytoplasm to vacuole transport* essentiellen Atg- und Cvt-Proteine und die zugehörigen Alternativ- sowie ORF-Bezeichnungen auf. Eine vollständige Präsentation der Ergebnisse aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutanten ist im Anhang in Abschnitt B auf Seite 151 zu finden.

Die Mutanten  $\Delta atg21$ ,  $\Delta atg23$ ,  $\Delta atg26$  und  $\Delta atg27$  wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da die Beteiligung der korrespondierenden Proteine an der Autophagocytose zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung noch nicht bekannt war, bzw. die zugehörigen ORFs noch nicht identifiziert waren. Aus dem gleichen Grund konnten für die Untersuchung von Atg24p und Cvt3p nur die Originalmutanten *atg24* (*cvt13-1*) und *cvt3* (*cvt3-1*) verwendet werden.

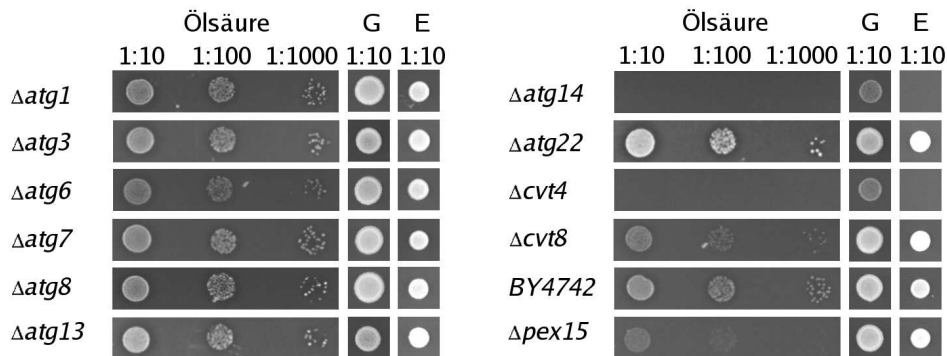
Zu Beginn der Arbeit wurde untersucht, ob die Mutanten Ölsäure abbauen können. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen der Mutanten auf Glucose-, Ethanol- und Ölsäurefestmedien aufgetragen und für 3, 5 und 6 Tage bei 30°C inkubiert. Der Wildtyp SEY6210 wächst nicht auf Ölsäure (nicht gezeigt). Daher konnte mit den zugehörigen Mutanten (*cvt3* und *atg24*) kein Wachstumstest auf Ölsäure durchgeführt werden.

Von den zum BY4742-Wildtyp isogenischen Mutanten waren außer  $\Delta atg14$  und  $\Delta cvt4$  alle Mutanten in der Lage auf Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle

Protein	ORF	Alternativbezeichnung
<b>Atg1p</b>	YGL180w	Aut3p, Cvt10p, Apg1p
<b>Atg2p</b>	YNL242w	Spo72p, Aut8p, Apg2p
<b>Atg3p</b>	YNR007c	Apg3p, Aut1p
<b>Atg4p</b>	YNL223w	Apg4p, Aut2p
<b>Atg5p</b>	YPL149w	Apg5p
Atg6p	YPL120w	<b>Vps30p</b> , Apg6p, Vpt30p
<b>Atg7p</b>	YHR171w	Cvt2p, Apg7p
<b>Atg8p</b>	YBL078c	Apg8p, Cvt5p, Aut7p
<b>Atg9p</b>	YDL149w	Aut9p, Cvt7p, Apg9p
<b>Atg10p</b>	YLL042c	Apg10p
<b>Atg11p</b>	YPR049c	Cvt9p
<b>Atg12p</b>	YBR217w	Apg12p
<b>Atg13p</b>	YPR185w	Apg13p
<b>Atg14p</b>	YBR128c	Cvt2p, Apg14p
<b>Atg15p</b>	YCR068w	Aut5p
<b>Atg16p</b>	YMR159c	Sap18p, Cvt11p, Apg16p
<b>Atg17p</b>	YLR423c	Apg17p
<b>Atg18p</b>	YFR021w	Nmr1p, Cvt18p, Aut10p, Svp1p
<b>Atg19p</b>	YOL082w	Cvt19p
<b>Atg20p</b>	YDL113c	Snx42p, Cvt20p
<b>Atg21p</b>	YPL100w	Mal1p, Hsv1p
<b>Atg22p</b>	YCL038c	Aut4p
<b>Atg23p</b>	YLR431c	Cvt23p
Atg24p	YJR036w	Cvt13p, <b>Snx4p</b>
<b>Atg26p</b>	YLR189c	Utg51p
<b>Atg27p</b>	YJL178c	Eft1p
Cvt3p	unbekannt	
Cvt4p	YDL077w	<b>Vam6p</b> , Vps39p
Cvt8p	YDR080w	Vam2p, <b>Vps41p</b>

**Tabelle 4.1: Überblick Autophagocytoseproteine:** Aufgeführt sind alle bisher bekannten Atg- und Cvt-Proteine. Zusätzlich sind der ORF und alternativer Benennungen angegeben. Die offizielle Bezeichnung wurde jeweils durch Fettdruck hervorgehoben.

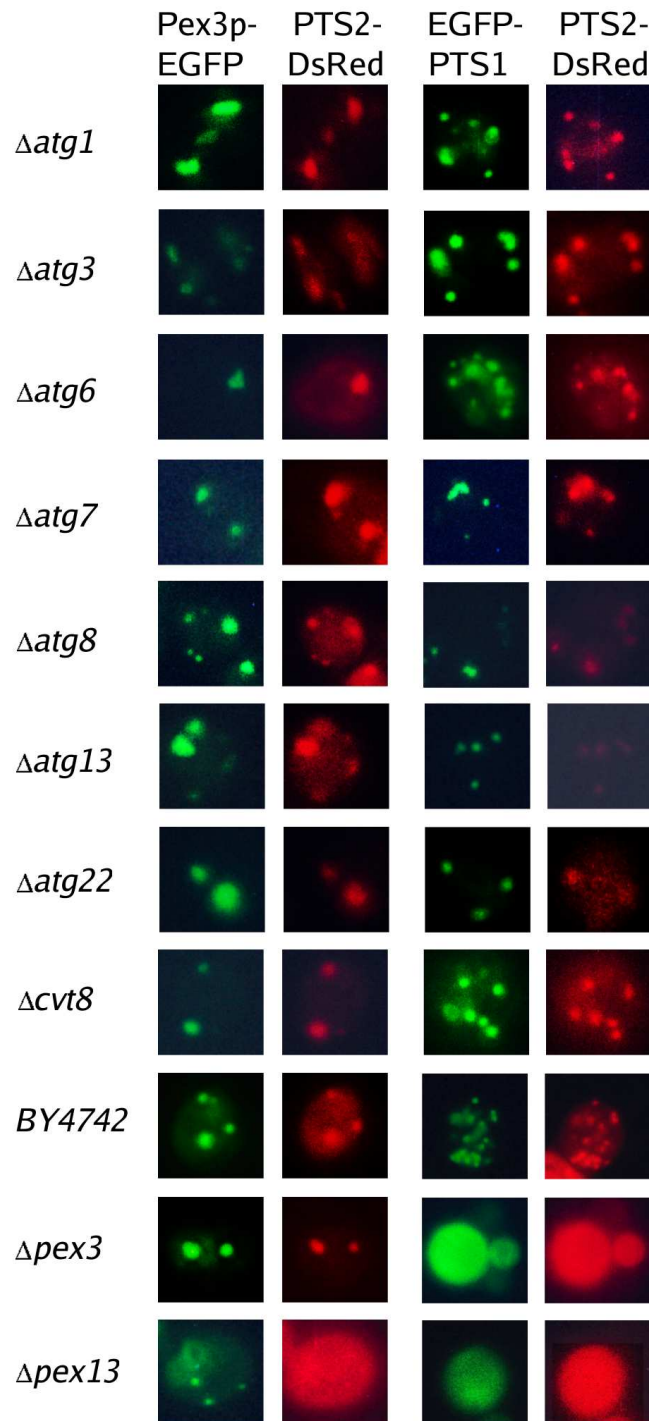
zu wachsen (s. Abb. 4.11).  $\Delta atg14$  und  $\Delta cvt4$  zeigten kein Wachstum auf Ethanol- und Ölsäuremedium und ein stark vermindertes Wachstum auf SD-Medium mit 0,3% Glucose.



**Abbildung 4.11: Wachstum auf Ölsäure – ausgewählte *atg*-Mutanten:** Gezeigt ist der Wachstumstest ausgewählter *atg*-, *aut*- und *cvt*-Mutanten. Hierfür wurde eine Zellsuspension ( $OD_{600}=1$ ) der jeweiligen Mutanten 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und je  $2\mu\text{l}$  auf 0,3%-SD-Medium (3 Tage), Ethanolmedium (5 Tage) und Ölsäuremedium (6 Tage) aufgetragen und die Zellen bei  $30^\circ\text{C}$  für die angegebene Zeit inkubiert. (G-SD-Medium mit 0,3% Glucose, E-Ethanolmedium)

Alle Mutanten wurden jeweils mit Pex3p-GFP und PTS2-DsRed und mit EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed transformiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei den Mutanten  $\Delta atg14$  und  $\Delta cvt4$  konnten die Reporterkonstrukte nicht detektiert werden. Bei allen anderen untersuchten Mutanten waren alle Fluoreszenzmarker peroxisomal lokalisiert (s. Abb. 4.12 auf der nächsten Seite). Diese Mutanten zeigten somit keinen mit den verwendeten Methoden detektierbaren Defekt in der Peroxisomenbiogenese.

Da die Mutanten  $\Delta atg14$  und  $\Delta cvt4$  einen generellen Wachstumsdefekt zeigten und die peroxisomalen Fluoreszenzmarker nicht exprimierten, sollte die subzelluläre Lokalisation endogener peroxisomaler Marker biochemisch untersucht werden. Dazu wurde wie schon für die ER-Mutanten in Abschnitt 4.1.2 auf Seite 66 beschrieben, die subzelluläre Lokalisation der peroxisomalen Katalase durch Aktivitätsmessung bestimmt. Dabei konnte in den Mutanten  $\Delta atg14$ ,  $\Delta cvt8$  und  $\Delta cvt4$  eine höhere Katalaseaktivität im cytosolischen Überstand als im Or-



**Abbildung 4.12: Fluoreszenzaufnahmen ausgewählter *atg*-Mutanten:** Einzelzellenaufnahmen von Ölsäure induzierten Zellen. Die Mutanten exprimierten entweder Pex3p-EGFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed. Es werden nur ausgewählte *atg*-Mutanten gezeigt. Eine vollständige Darstellung aller untersuchten *atg*-Mutanten ist im Anhang B (S. 151) zu finden.

ganellenpellet gemessen werden (s. Abb. 4.13 A). Bei allen anderen Mutanten war die Aktivität – wie im Wildtyp – im Organellenpellet höher als im cytosolischen Überstand.

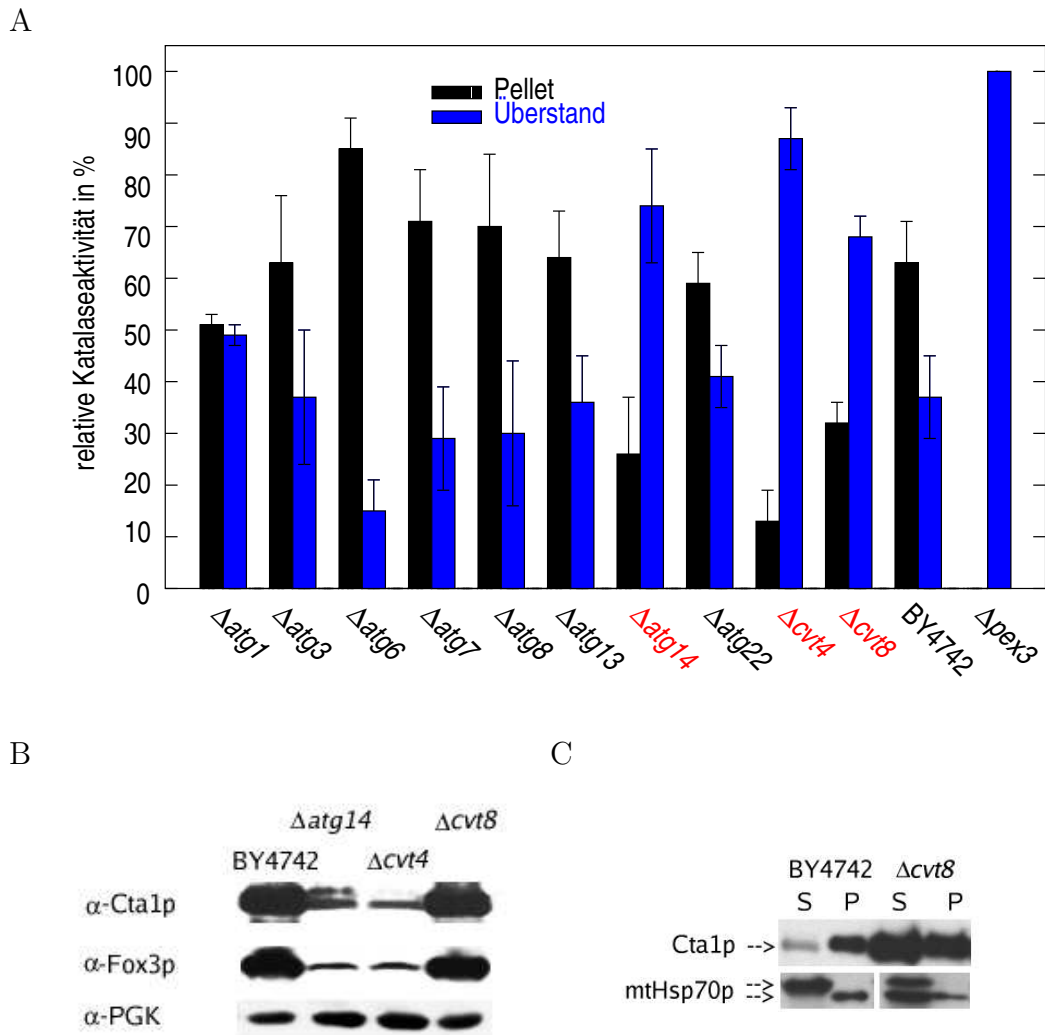
Wie bereits beschrieben ist die Aktivitätsmessung jedoch nicht streng spezifisch für peroxisomale Katalase. Ist die Expression der peroxisomalen Katalase gestört, kann bei verringerter Gesamtaktivität, eine höhere Enzymaktivität im Überstand als im Pellet gemessen werden. Mit der verwendeten Methode (s. Abschn. 3.3.4, S. 46) sind die absoluten Aktivitäten verschiedener Anzuchten nicht vergleichbar. Deshalb wurde die Expressionsstärke von Katalase in Gesamtzellauflösungen im Immunoblot detektiert (s. Abb. 4.13 B). Dadurch sollte festgestellt werden, ob die beobachtete Verschiebung der Enzymaktivität auf Misslokalisierung der peroxisomalen Katalase oder auf eine verringerte Expression zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass in den Mutanten  $\Delta atg14$  und  $\Delta cvt4$  sowohl peroxisomale Katalase (Cta1p) als auch peroxisomale Thiolase (Fox3p) nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Die Expression von Katalase und Thiolase in  $\Delta cvt8$ -Mutanten entsprach dem des korrespondierenden Wildtyps BY4742.

Die Untersuchung der subzellulären Fraktionierung über Immunoblots bestätigt die Misslokalisierung von peroxisomaler Katalase in  $\Delta cvt8$ -Mutanten (s. Abb. 4.13 C) diese korreliert jedoch mit der Misslokalisierung von reifem mitochondrialem Hsp70p (mtHsp70p). Die Misslokalisierung ist demnach eher auf generelle Defekte der Zellen zurückzuführen (s. auch Abschn. 4.1.1, S. 62). Durch die geringe Expression konnte in den subzellulären Fraktionen von  $\Delta atg14$  und  $\Delta cvt4$  keine Katalase detektiert werden.

## 4.1.5 Pex16p-Homologiesuche

Pex16p ist im Menschen essentiell für die peroxisomale Membranbiogenese [143]. Außerdem ist Pex16p in *Y. lipolytica* in Sekretionsmutanten transient und in *pex1*- und *pex6*-Mutanten permanent mit dem ER assoziiert [153]. Die Untersuchung von Pex16p ist daher wichtig für das Verständnis der „frühen“ peroxisomalen Membranbiogenese. In *S. cerevisiae* konnte noch kein Pex16p-Orthologes identifiziert werden. Die Homologiesuche in *S. cerevisiae* lieferte fünf Proteine mit geringer Sequenzähnlichkeiten zum Pex16p aus *Y. lipolytica* [54].

Yer134cp und Yol075cp wurden noch nicht charakterisiert. Rec107p wurde



**Abbildung 4.13: Subzelluläre Fraktionierung *atg*-Mutanten:** (A) Relative Katalaseaktivitäten in Überstand und Pellet der 25.000g Zentrifugation ausgewählter *atg*-Mutanten. Dargestellt ist das arithmetische Mittel der Messungen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (n=4) dar. (B) Gleiche Mengen Gesamtzellaufschluss einzelner ölsäureinduzierter Mutantenzellen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend im Immunoblot die Expression von Cta1p (peroxisomale Katalase), Fox3p (peroxisomale Thiolase) und Phosphoglyceratkinase (PGK) verglichen. (C) Gleiche Mengen Überstand und Pellet aus der 25.000g Zentrifugation des PNS von Wildtyp und  $\Delta cvt8$ -Zellen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Verteilung der peroxisomalen Katalase und des mitochondrialen Matrixproteins mtHsp70p im Immunoblot analysiert. (Obere Bande - prä-mtHsp70p, untere Bande - reifes mtHsp70p)

---

als nukleär lokalisierte Rekombinase [122] identifiziert. Für Ifh1p wurde eine Beteiligung an der RNA-Prozessierung [17] und bei der Bildung von Hetrochromatin [136] nachgewiesen. Da *IFH1*-Deletionen nicht lebensfähig sind, wurde die Funktion von Ift1p in der Peroxisomenbiogenese in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Kap114p ist am Proteintransport einiger Protein vom Cytoplasma in den Kern beteiligt [114].

Es wurden bereits für mehrere Peroxine zusätzliche Funktionen beim Kerntransport (Pex19p [159, 149]) oder bei der Transkriptionsregulation im Kern (Pex14p [39]) beschrieben. Außerdem ist Pex16p in Pflanzen an der Lipidbodybildung im ER beteiligt [95]. Daher sollten – trotz der schon bekannten und recht unterschiedlichen Funktionen von Rec7p und Kap114p – auch diese Proteine auf eine Funktion in der Peroxisomenbiogenese untersucht werden.

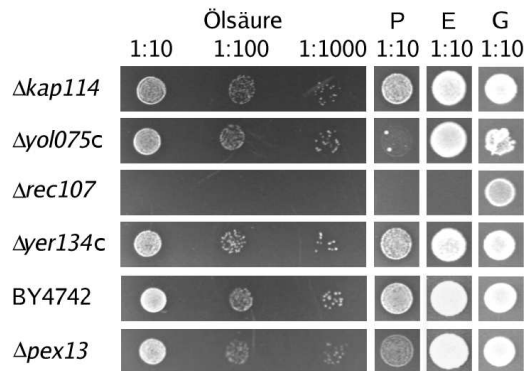
Drei der vier untersuchten Mutanten zeigten keinen Wachstumsdefekt auf Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle (s. Abb. 4.14 auf der nächsten Seite) und eine peroxisomale Lokalisation der untersuchten Fluoreszenzmarker (siehe Abbildung 4.15 auf der nächsten Seite). Die Mutante  $\Delta rec107$  wuchs nicht auf Ölsäure- und Ethanolmedium und zeigte ein vermindertes Wachstum auf SD-Medium mit 0,3% Glucose. Außerdem konnten die peroxisomalen Reporterkonstrukte EGFP-PTS1, PTS2-DsRed und Pex3p-EGFP in  $\Delta rec107$ -Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nicht detektiert werden.

## 4.2 Untersuchung von *ghosts*

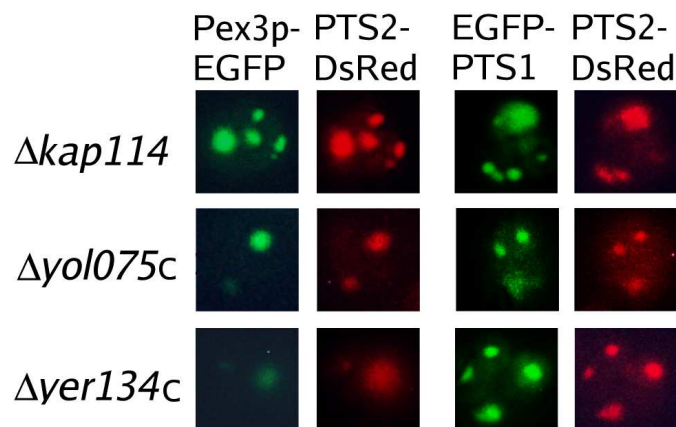
In den meisten *pex*-Mutanten sind leere, peroxisomale Membranstrukturen – so genannten *ghosts* – detektierbar [4, 30, 45]. In *pex3*-, *pex16* und *pex19*-Mutanten können keine *ghosts* detektiert werden [143, 142, 56]. Die meisten peroxisomalen Membranproteine sind in diesen Mutanten instabil [56]. Peroxisomale Matrixproteine sind cytosolisch lokalisiert [4, 30, 45]. In humanen Fibroblasten sind die mitochondrialen Membranproteine Pex14p, Pex3p, Pex12p und ALDP $\beta$  in *pex19*-Mutantenzellen mit mitochondrialen Strukturen kolokalisiert [126].

### 4.2.1 Saccharosegradientenzentrifugation

In *S. cerevisiae* sind in  $\Delta pex3$ - und  $\Delta pex19$ -Mutanten viele peroxisomale Membranproteine instabil oder cytosolisch misslokalisiert [56]. Pex14p ist in diesen



**Abbildung 4.14: Wachstumstest auf Ölsäure – Pex16p-Homologiesuche:** Je  $2\mu\text{l}$  einer 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnten Zellsuspension ( $\text{OD}_{600}=1$ ) wurden auf SD-Medium mit 0,3% Glucose, Ethanol-, Ölsäure- und Petrosilinsäurefestmedien aufgetragen und für 3, 5 und 6 Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. (P-Petrosilinsäuremedium, G-SD-Medium mit 0,3% Glucose, E-Ethanolmedium) Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung des Wachstumstest gibt Abschnitt 3.2.6 auf Seite 38.



**Abbildung 4.15: Fluoreszenzaufnahmen – Pex16p-Homologiesuche:** Einzelzellfluoreszenzaufnahmen von Pex3p-GFP und PTS2-DsRed oder EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed exprimierenden Zellen. (Durchführung siehe Abschnitt 3.3.3 auf Seite 45)



Mutanten stabil und mit Membranen assoziiert. Zur weitergehenden Charakterisierung der Phänotypen von  $\Delta pex3$  und  $\Delta pex19$  wurde zunächst eine Saccharosegradientenzentrifugation vom PNS<sup>2</sup> (Präparation s. Abschn. 3.4.3, S. 49) dieser Mutanten durchgeführt. Eine Beschreibung findet sich in Abschnitt 3.4.4 auf Seite 49. Im Saccharosegradienten können Organellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte voneinander getrennt werden und die Verteilung der Organellenproteine durch Aktivitätsmessung oder im Immunoblot detektiert werden.

Peroxisomen haben eine Dichte von 1.20g/ml bis 1.4g/ml [97]. Die Dichte von Mitochondrien beträgt 1.18-1.21g/ml [97]. Die beim Aufschluss der Zellen aus dem endoplasmatischen Reticulum entstehenden Mikrosomen haben sehr unterschiedliche Dichten (1.06-1.23g/ml [97]). Proteine des endoplasmatischen Reticulums sind deshalb über den gesamten Gradienten verteilt. Cytosolische Proteine sind im Bereich geringer Dichte detektierbar. Die Dichte von Proteinen liegt zwischen 1.2g/ml und 1.7g/ml [97]. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist jedoch auf Grund ihrer geringen Masse so niedrig, dass sie bei der hier durchgeführten Zentrifugation nicht oder nur geringfügig in den Gradienten einwandern. Hierfür wären wesentlich längere Zentrifugationszeiten und höhere Winkelgeschwindigkeiten notwendig.

## Wildtyp

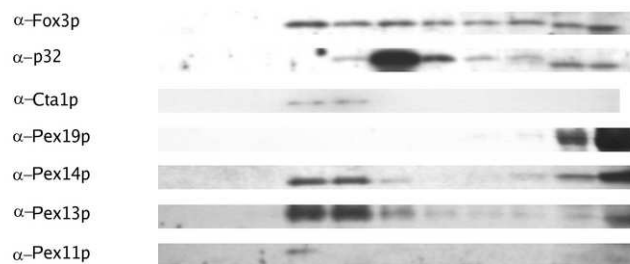
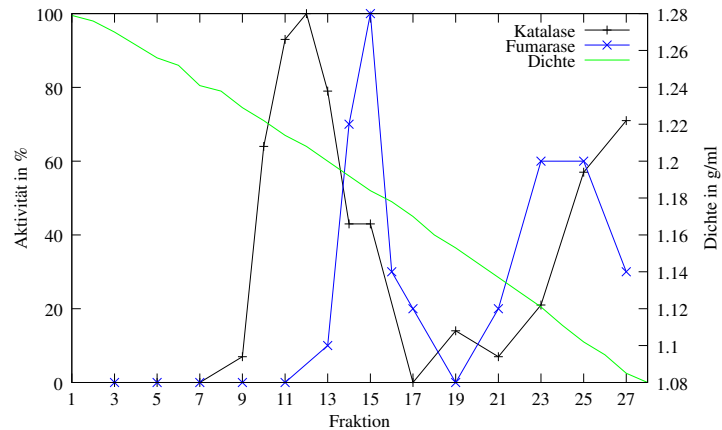
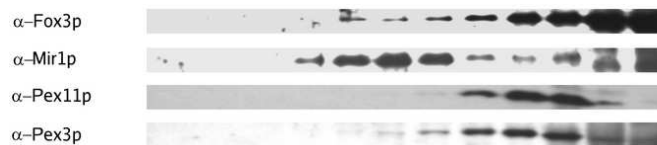
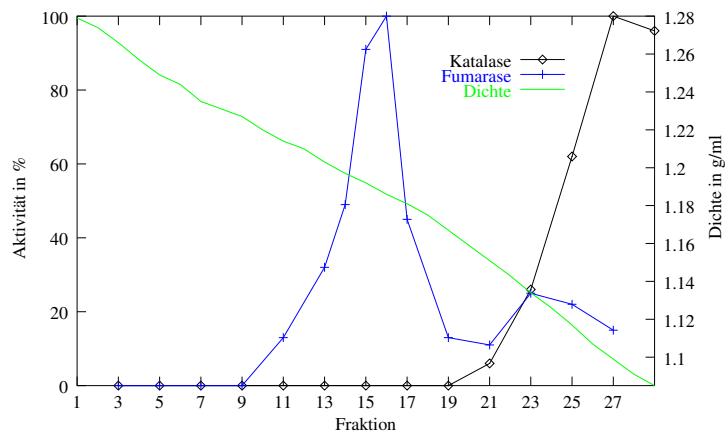
Peroxisomen haben in *S. cerevisiae* eine Dichte von 1.20 bis 1.22g/ml (Fraktionen 9-13 Abb. 4.16 auf der nächsten Seite). Bei dieser Dichte sind die Fraktionen mit der höchsten Konzentration an peroxisomalen Matrixproteinen zu finden. Die für die Katalase messbaren Aktivitäten in den Fraktionen 21-27 sind zum einen auf die Aktivität der cytosolischen Katalase zurückzuführen. Zum anderen enthalten diese Fraktionen neusynthetisierte und beim Aufschluss aus den Peroxisomen freigesetzte Katalase. Aus diesen Gründen sind in den Fraktionen 21-27 auch die Fumarase und die peroxisomale Thiolase (Fox3p) detektierbar.

Die peroxisomalen Membranproteine Pex13p, Pex14p und Pex11p sind zum größten Teil in den Fraktionen 9-13 zu finden. Pex19p kann ausschließlich in den Fraktionen 23 bis 25 detektiert werden.

Die höchste Konzentration des mitochondrialen Matrixproteins Fumarase ist in den Fraktionen 13-17 bei einer Dichte von 1,18 bis 1,2g/ml detektierbar, siehe

---

<sup>2</sup>*post nuclear supernatant*

*BJ1991**BJ Δpex14*

**Abbildung 4.16: Saccharosegradienten Wildtyp und  $\Delta pex14$ :** Von einem Saccharosegradienten (32-54% (w/w)) wurde in den entnommenen Fraktionen die Dichte (g/ml) und die relative Enzymaktivität der Katalase und der Fumarase ermittelt und über den Fraktionen aufgetragen (Graph jeweils oberer Teil). Von jeder zweiten Fraktion wurden gleiche Mengen auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Lokalisation peroxisomaler und mitochondrialer (Mir1p) Proteine im Immunoblots detektiert. (Durchführung s. Abschn. 3.4.4, S. 49)

dazu Abbildung 4.16 auf der vorherigen Seite. Der größte Teil des mitochondrialen Membranproteins Mir1p ist ebenfalls in den Fraktionen 13-17 nachweisbar. Die mit dem Mir1p-Antikörper in den Fraktionen 23 bis 25 nachweisbare Proteinbande ist auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen.

### ***Δpex14***

In *Δpex14* können im Saccharosegradienten keine peroxisomalen Proteine bei der Dichte von Wildtyperoxisomen (1,20-1,22 g/ml) detektiert werden (s. Abb. 4.16). Die peroxisomale Matrixproteine Katalase und Thiolase sind zum Cytosol misslokalisiert und deswegen im niedrigen Dichtebereich cytosolischer Proteine detektierbar (Fraktionen 21-27 Abb. 4.16). Die peroxisomalen Membranproteine Pex11p und Pex3p sind bei einer Dichte von 1,4 bis 1,6 g/ml (Fraktionen 19-23) detektierbar. Sie sind bei einer höheren Dichte als Katalase und Thiolase zu finden, da sie mit Membranen, den sogenannten *ghosts* assoziiert sind [30, 43]. Die mitochondrialen Proteine Mir1p und Fumarase sind, wie in Wildtypzelle, bei einer Dichte von 1,18 bis 1,2g/ml detektierbar.

### ***Δpex19***

In *Δpex19*-Mutanten können die in *Δpex14* bei einer Dichte von 1,4 bis 1,6g/ml detektierbaren peroxisomalen Membranstrukturen nicht im Saccharosegradienten (s. Abb. 4.17) nachgewiesen werden. Sie können auch nicht nach Immungoldmarkierung von Pex11p mit Hilfe des Elektronenmikroskops detektiert werden [56].

Pex14p kolokalisiert mit den mitochondrialen Markerproteinen Fumarase und Mir1p (Fraktionen 13-17) und ist außerdem in Dichten nachweisbar in denen in *Δpex14* (s. Abb 4.16) peroxisomale Membranproteine detektiert werden können (Fraktionen 19-23). Pex3p, Pex13p und Pex11p sind in *Δpex19* instabil und dadurch nur sehr schwer nachzuweisen. Geringe Mengen von Pex3p und Pex13p sind jedoch in den mitochondrialen Fraktionen (13-17) detektierbar. Pex11p ist in *Δpex19* cytosolisch misslokalisiert und in den Fraktionen 23-27 nachweisbar.

Da die Kreuzreaktionen des Pex3p-Antikörpers die Detektion von möglichem Pex3p in den cytosolischen Fraktionen (21-27) verhinderte, wurde zusätzlich eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt (Durchführung s. Abschn. 3.5.5, S. 54). Wie in Abbildung 4.18 zu erkennen ist, kann Pex3p nur im Organellenpellet und

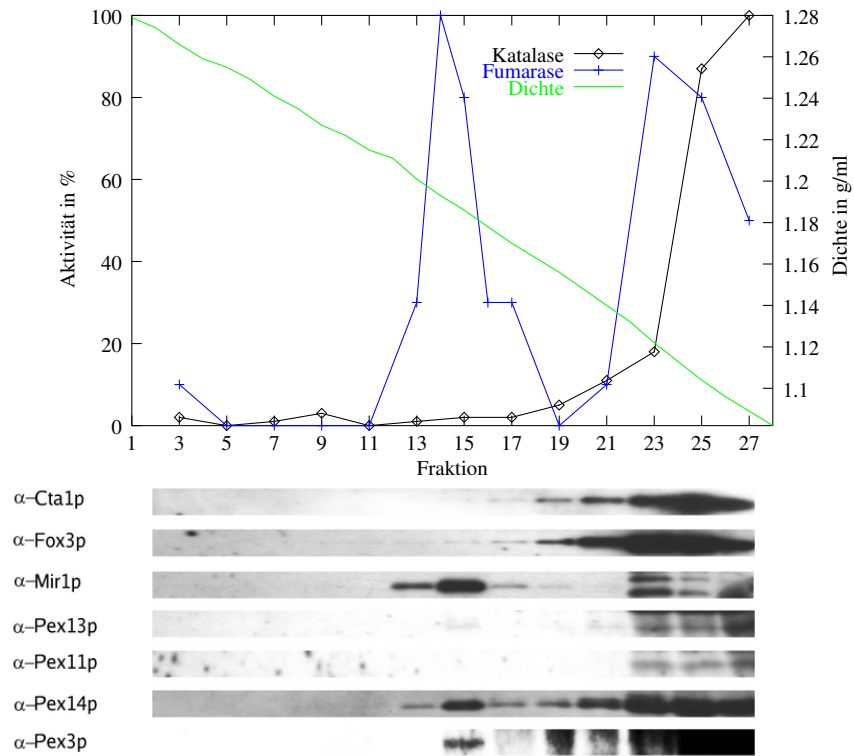
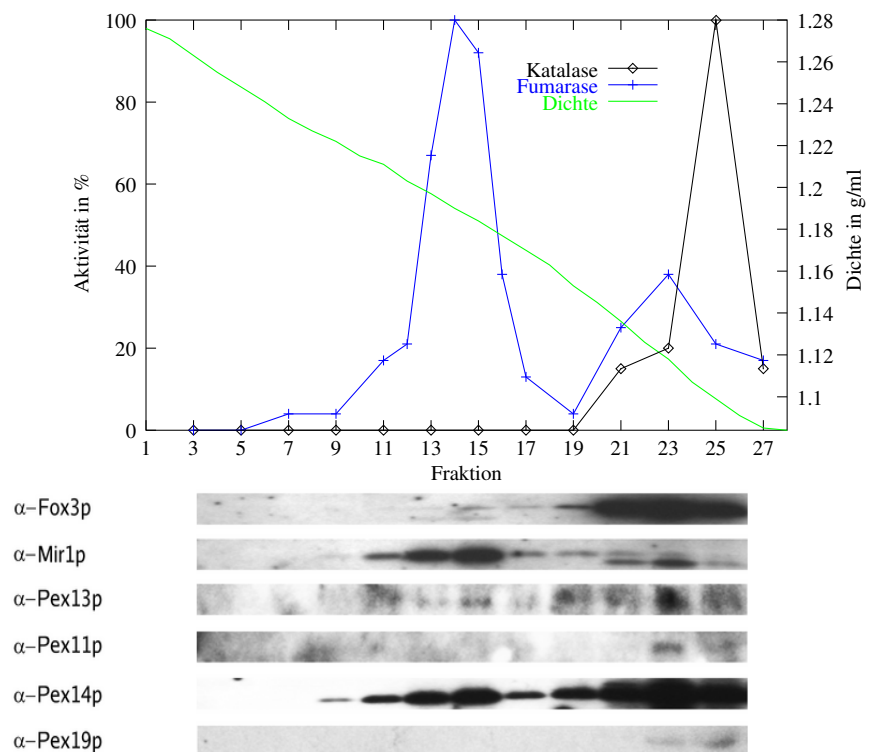
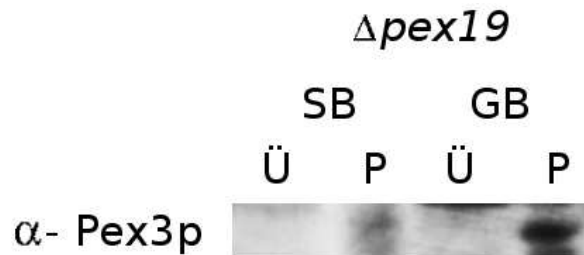
*BJ*  $\Delta pex19$ *BJ*  $\Delta pex3$ 

Abbildung 4.17: Saccharosegradienten  $\Delta pex19$  und  $\Delta pex3$ : (Beschreibung siehe Abbildung 4.16 auf Seite 82)

nicht im cytosolischen Überstand detektiert werden. Da Pex3p im PNS nach Homogenisierung von Spheroplasten nur schwer detektierbar war, wurden zusätzlich ganze Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen. In diesen Homogenaten konnte Pex3p ausschliesslich im Membranpellet nachgewiesen werden (Abb. 4.18).



**Abbildung 4.18: Subzelluläre Fraktionierung  $\Delta pex19$ :**  $\Delta pex19$ -Zellen wurden entweder mit Glasperlen (GP) oder nach Spheroplastierung (SP) mit Spritze und Kanüle aufgeschlossen. Die daraus resultierenden zellfreien Homogenate wurden bei 200.000g für 30 Minuten zentrifugiert. Vom cytosolischen Überstand (Ü) und dem Organellenpellet (P) wurden gleiche Teile auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Verteilung des Pex3p im Immunoblot detektiert.

### $\Delta pex3$

Auch in  $\Delta pex3$  können keine peroxisomalen *ghosts* detektiert werden (siehe Abbildung 4.17 auf der vorherigen Seite). Pex14p und Pex13p kolokalisieren in  $\Delta pex3$  mit den mitochondrialen Markerproteinen Mir1p und Fumarase. Pex11p und Pex19p sind cytosolisch lokalisiert. Pex11p, Pex13p und Pex19p sind in  $\Delta pex3$  nur in sehr geringen Mengen zu finden.

## 4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Um zu klären, ob die Pex14p, Pex3p und Pex13p enthaltenden Membranstrukturen in  $\Delta pex3$  und  $\Delta pex19$ -Zellen Mitochondrien sind, wurden die Mutanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierfür wurde ein Pex14p-EGFP Fusionskonstrukt hergestellt. Außerdem wurde das schon beschriebene Pex3p-EGFP Fusionskonstrukt (s. Abschn. 4.1.1 S. 58) verwendet. Für die Markierung der Mitochondrien wurde ein DsRed mit mitochondrialem Targetingsignal (Mito-DsRed/pRS424 [161]) verwendet. Wie in Abbildung 4.19 auf Seite 87 zu erken-

nen ist, sind die Pex14p-haltigen Strukturen klar von Mitochondrien unterscheidbar. Die Pex3p-haltigen Strukturen scheinen mit Mitochondrien kolokalisiert zu sein. Die Auflösung des Fluoreszenzmikroskops ist jedoch zu gering um nebeneinanderliegende Organellen voneinander zu unterscheiden. Da sich außerdem das von Pex3p-EGFP erzeugte Fluoreszenzmuster deutlich vom mitochondrialen Fluoreszenzmuster unterscheidet und auch im Wildtypstamm eine Überlappung des Peroxisoms mit den Mitochondrien beobachtet werden konnte (s. Abb. 4.19B), ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei den Pex3p-haltigen Membranstrukturen um Mitochondrien handelt. Beide Peroxine werden also im Gegensatz zu menschlichen Fibroblasten [126] nicht zu Mitochondrien misslokalisiert.

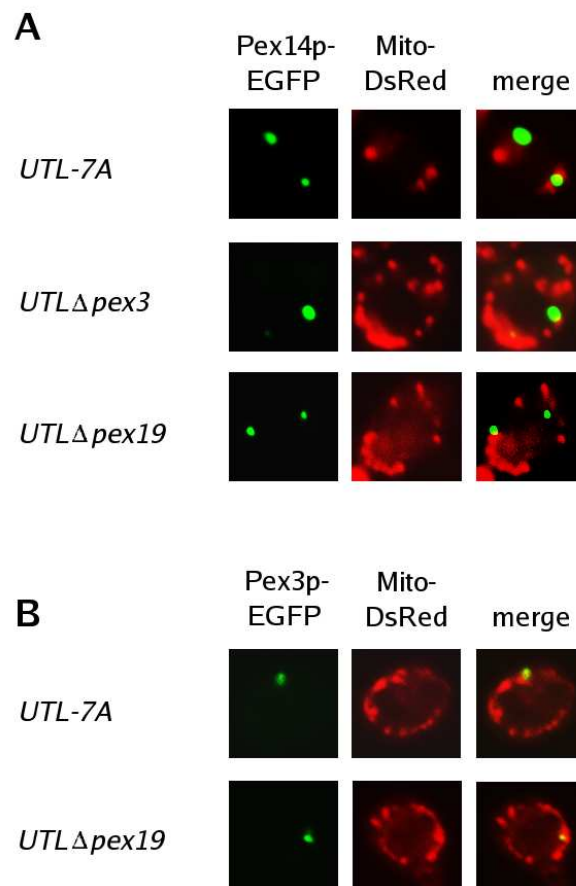
Um sicher zu stellen, dass die beobachtete Lokalisation nicht durch die Fusion mit EGFP verursacht wird, wurde die Pex14p-Lokalisation zusätzlich mit immunfluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht (s. Abb. 4.20 auf Seite 88). Für die Markierung der Mitochondrien wurde in diesem Fall ein EGFP mit mitochondrialem Targetingsignal (Mito-EGFP/pVT100 [161]) verwendet. Die Detektion des EGFP erfolgte mit dem mouse-anti-AFP<sup>3</sup>-Antikörper der Firma Q-BIOgene. (Durchführung siehe Abschnitt 3.2.10 auf Seite 43)

## 4.3 Der Pex3p-Komplex

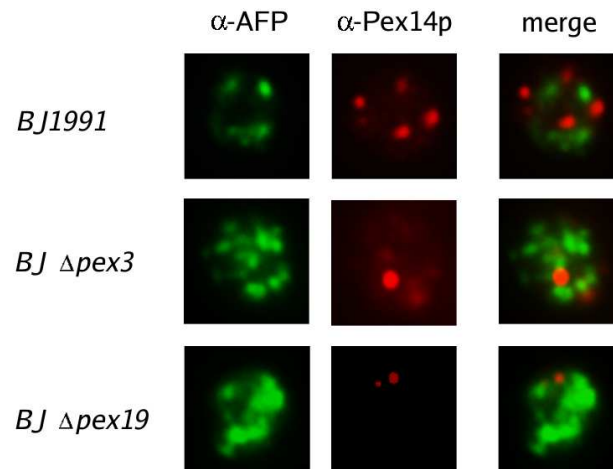
Über Struktur und Funktion von Pex3p ist sehr wenig bekannt. In *pex3*-Mutanten sind keine typischen Pmp-haltigen Membranstrukturen (*ghosts*) detektierbar [56, 142]. Die meisten peroxisomalen Membranproteine sind in diesen Mutanten instabil. Deshalb wird Pex3p eine Rolle bei der „frühen“ peroxisomalen Membranbiogenese zugeschrieben. Da Pex3p in *S. cerevisiae* ein integrales peroxisomales Membranprotein ist, das Pex19p unabhängig in die Peroxisomen importiert wird [33] und mit Pex19p interagiert [23, 48, 103, 126, 139], wurde weiterhin postuliert, dass Pex3p als Membranproteinrezeptor oder als Translokation fungiert [57, 131]. Als Interaktionspartner konnten bisher nur Pex15p [23] und Pex19p identifiziert werden.

---

<sup>3</sup>*all fluorescent proteins*



**Abbildung 4.19: Lokalisation von Pex3p und Pex14p in „frühen“ *pex*-Mutanten** : Fluoreszenzaufnahmen von ölsäureinduzierten Einzelzellen. Alle Zellen exprimierten Pex14p-EGFP (A) bzw. Pex3p-EGFP (B) und ein DsRed mit mitochondrialer Signalsequenz (Mito-DsRed/pRS424 [161]). (merge=Überlagerung des roten und des grünen Fluoreszenzbildes)



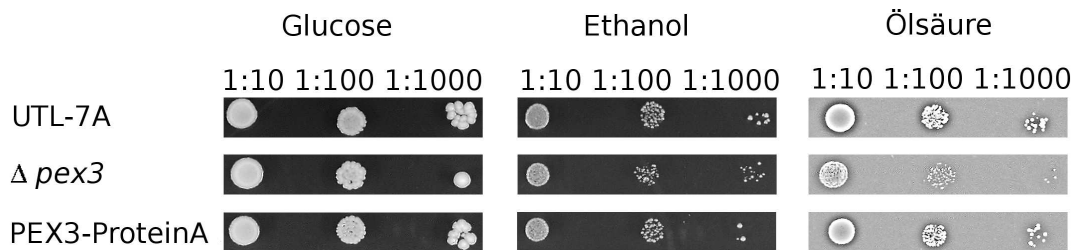
**Abbildung 4.20: Immunfluoreszenzmarkierung von Pex14p in „frühen“ *pex*-Mutanten :** Fluoreszenzaufnahmen von fixierten, ölsäureinduzierten Einzelzellen die mit Pex14p-Antikörpern (Zweitantikörper Alexa-Fluor<sup>TM</sup> 568 (rot) gekoppelt) und einem Antikörper gegen GFP ( $\alpha$ -AFP, Zweitantikörper Alexa-Fluor<sup>TM</sup> 488 (grün) gekoppelt) inkubiert wurden. Die Zellen exprimierten ein GFP mit mitochondrialer Targetingsequenz (Mito-EGFP/pVT100 [161]). Die dritte Spalte zeigt die Überlagerung des roten und des grünen Fluoreszenzbildes (merge).

### 4.3.1 Pex3p-Protein A

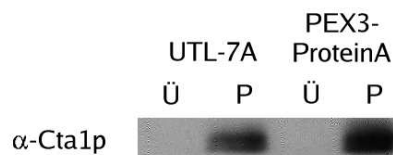
Für eine weitergehende Charakterisierung des postulierten Membranproteinrezeptor- bzw. Translokonkomplexes wurde in der vorliegenden Arbeit Pex3p C-terminal mit Protein A fusioniert. Das Protein A wurde dabei vor dem Stopp des *PEX3*-ORFs genomisch integriert. Der hierdurch erzeugte Stamm wurde mit *PEX3-ProteinA* oder kurz *PEX3-ProtA* bezeichnet. Die genomische Integration des Markers ermöglicht die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen Promotors. Mögliche Fehlregulationen und Überexpressionen werden dadurch weitgehend ausgeschlossen. Da die Fusion die Funktionalität des Proteins beeinflussen kann, wurde zu Beginn der Arbeit überprüft, ob die Zellen Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können (Durchführung s. Abschn. 3.2.6, S. 38). Wie in Abbildung 4.21 auf der nächsten Seite zu erkennen ist, können Pex3p-ProteinA exprimierende Zellen, wie Wildtypzellen auf ölsäurehaltigen Platten wachsen, die peroxisomale Mutante  $\Delta pex3$  jedoch nicht. Zusätzlich wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt (s. Abschn. 3.3.4, S. 46) und die Verteilung von peroxisomaler Katalase im Westernblot überprüft. Die Abbil-



Abbildung 4.22 zeigt, dass die peroxisomale Katalase in Wildtyp- und *PEX3-ProteinA*-Zellen ausschließlich im Organellenpellet nachweisbar ist. Das bedeutet, dass das Pex3p-ProteinA Fusionsprotein funktionell ist.



**Abbildung 4.21: Wachstumstest auf Ölsäure:** Zellen des Wildtyps (UTL-7A) und des *PEX3-ProteinA*-Stamms sind in der Lage auf Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es ist im Gegensatz zu  $\Delta pex3$  eine deutliche Hofbildung erkennbar. Es wurden Zellsuspensionen ( $OD_{600}=1$ ) in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf Ölsäuremedium aufgetragen. Ethanol- und Glucosemedien dienen als Kontrolle für generelle Wachstumsdefekte.



**Abbildung 4.22: Subzelluläre Fraktionierung der peroxisomalen Katalase:** Äquivalente Mengen von Pellet und Überstand einer 25.000g Zentrifugation wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und die Verteilung der peroxisomalen Katalase (Cta1p) im Immunoblot bestimmt.

### 4.3.2 Komplexisolierung

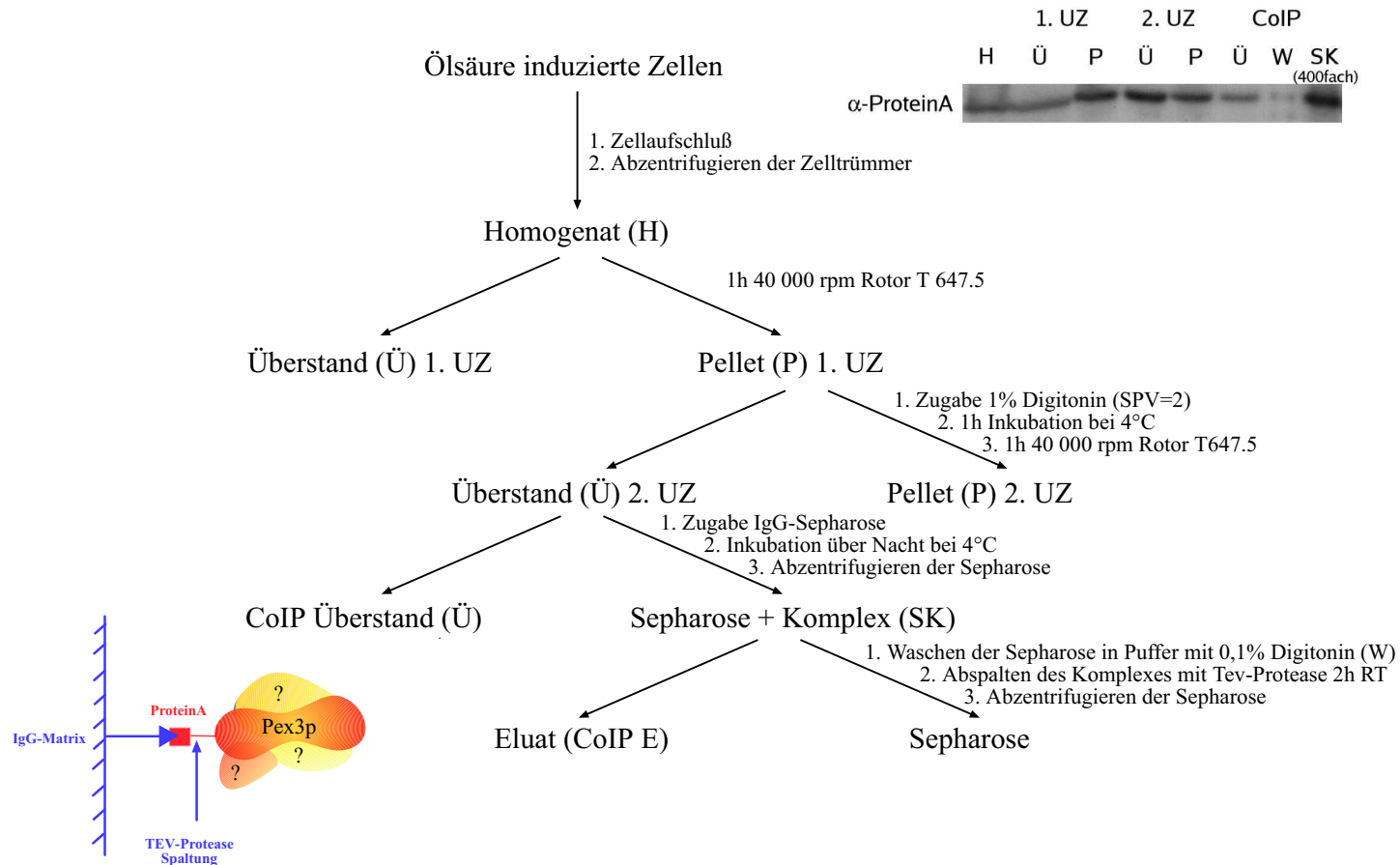
Zur Charakterisierung des putativen Pex3p-Komplexes wurde Pex3p-ProteinA durch Bindung an IgG-Sepharose unter nativen Bedingungen aufgereinigt (Durchführung s. Abschn. 3.5.1, S. 51). Dazu wurden die Zellen unter hohem Druck aufgeschlossen und die Membranen abzentrifugiert (s. Abschn. 3.5.3, S. 52). Pex3p ist überwiegend membranassoziiert, kann aber in geringen Mengen im Überstand

der Zentrifugation detektiert werden (s. Abb. 4.23 auf der nächsten Seite). Auf den möglichen Ursprung dieser Pex3p-Fraktion wird in Abschnitt 4.3.5 auf Seite 97 näher eingegangen.

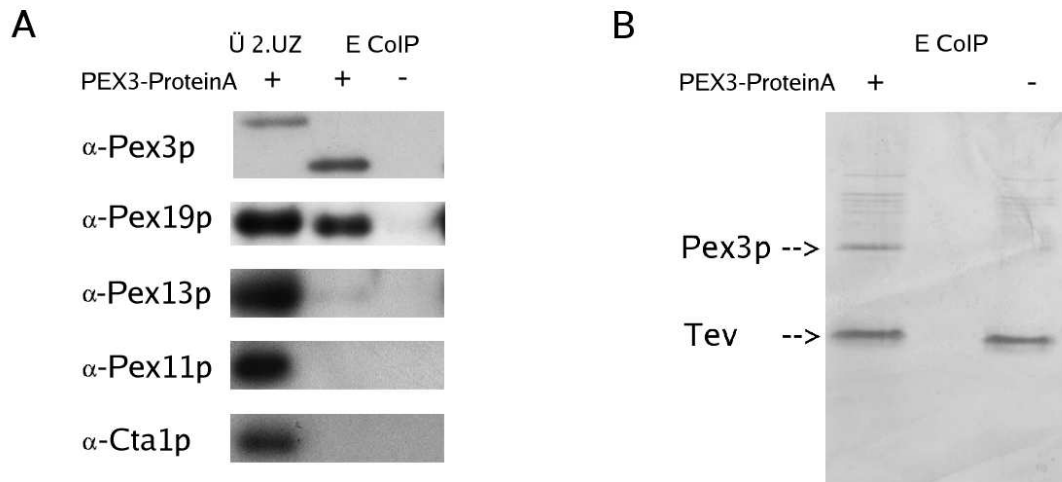
Die Membranproteine wurden mit Digitonin solubilisiert und nicht solubilierte Membranproteine abzentrifugiert (siehe Verlaufsschema in Abbildung 4.23 auf der nächsten Seite). Aus dem verbleibenden Überstand wurde Pex3p-ProteinA über die Bindung an IgG-Sepharose gereinigt. Nach dem Waschen der Sepharose wurde das Pex3p durch Tev-Protease von der IgG-Sepharose abgespalten (Durchführung s. Abschn. 3.5.3, S. 52).

Das Eluat wurde auf mitgereinigte Proteine untersucht. Im Immunoblot konnten hierbei außer Pex3p auch Pex13p und Pex19p nachgewiesen werden (s. Abb. 4.24 A). Alle anderen getesteten Peroxine (Liste s. Abschn. 3.2.9) konnten im Immunoblot nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Als Kontrolle für unspezifisch mitgereinigte peroxisomale Matrixproteine diente die peroxisomale Katalase (Cta1p). Pex11p wird als Markerprotein für möglicherweise unspezifisch mitgereinigte peroxisomale Membranproteine verwendet, da es das am stärksten exprimierte peroxisomale Membranprotein ist. Wie in Abbildung 4.24 A und 4.25 auf Seite 93 zu erkennen ist, wurde in keiner der Aufreinigungen Pex11p oder peroxisomale Katalase mitgereinigt. Auch die Silberfärbung eines parallel zum *PEX3*-ProteinA Stamm behandelten Wildtyps zeigte nur sehr wenige unspezifisch mitgereinigtem Proteine (s. Abb. 4.24 B). Für die Aufreinigung von Pex3p-ProteinA konnten mit der Silberfärbung keine spezifisch gebundenen Proteine detektiert werden.

Es wurde auch eine Aufreinigung aus dem cytosolischen Überstand (Überstand der ersten Ultrazentrifugation) durchgeführt und diese mit der Aufreinigung aus dem solubilierten Membranpellet verglichen. Wie in Abbildung 4.25 auf Seite 93 zu sehen ist, konnte – bezogen auf gleiche Mengen Pex3p – aus dem Überstand der ersten Ultrazentrifugation mehr Pex19p und Pex13p mitgereinigt werden, als aus den solubilierten Membranen. Es konnten keine weiteren Peroxine detektiert werden, obwohl die meisten Peroxine in geringen Mengen im Überstand der ersten Ultrazentrifugation detektierbar sind (nicht gezeigt).



**Abbildung 4.23: Verlaufsschema Pex3p-ProteinA-Komplexreinigung:** Schematische Darstellung der Komplexreinigung über IgG-Sepharose. Von jeder Fraktion wurden Proben entnommen und äquivalente Mengen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der enthaltene Anteil an Pex3-ProteinA wurde im Westernblot nachgewiesen. Für die Probe SK wurde ein Teil der gewaschenen Sepharose abgenommen und diese in SDS-Probenpuffer erhitzt. Es wurde davon im Verhältnis zu den anderen Proben die 400fache Menge aufgetragen. (SPV=Seife zu Protein Verhältnis)

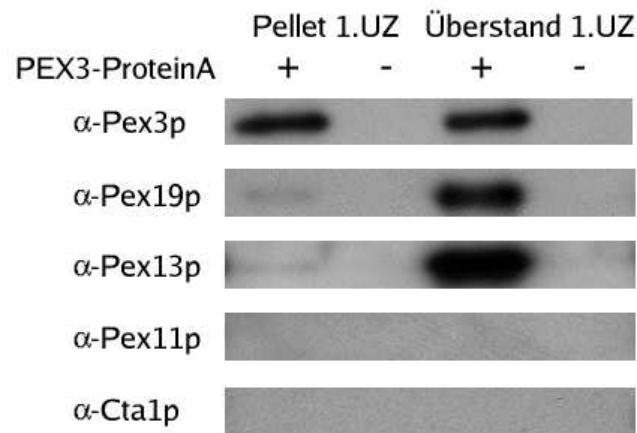


**Abbildung 4.24: Komplexreinigung Pex3p:** Dargestellt sind (A) die Immunoblots und (B) die Silberfärbung von SDS-Gelen der Eluate einer Pex3p-ProteinA Komplexreinigung aus solubilisierten Membranen. Als Kontrolle für den Antikörper wurde der Überstand der zweiten Ultrazentrifugation (Ü. 2.UZ) aufgetragen. Vom Eluat wurde dabei die 400fache Menge aufgetragen. Es wurden jeweils gleiche Mengen Eluat aus parallelen Aufreinigungen aus dem Wildtypstamm UTL-7A (-) und dem *PEX3*-ProteinA-Stamm (+) miteinander verglichen. (Ü 2.UZ = Überstand zweiter Ultrazentrifugationsschritt, ECoIP = Eluat der Komplexreinigung)

### 4.3.3 Blaue-Native Gelelektrophorese

Die Blaue-Native-Gelelektrophorese ist eine Methode zur nativen Auftrennung von Proteinkomplexen entsprechend Ihrer Größe. Da das Wanderungsverhalten in der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese jedoch nicht ausschließlich durch die Größe sondern auch durch die Form der Proteinkomplexe beeinflusst wird, kann mit dieser Methode die Größe des Komplexes nur annähernd bestimmt werden. Zusätzlich kann jedoch die Proteinzusammensetzung der Komplexe ermittelt werden.

Diese Methode sollte benutzt werden, um die Größe und die Komposition des postulierten Pex3p-Komplexes (bzw. der Pex3p-Komplexe) zu bestimmen. Dazu wurden Eluate einer Pex3p-Komplexreinigung über eine Blaue-Native-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Abschn. 3.5.4, S. 53). Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membranen transferiert und die Membran mit Antikörpern gegen Pex3p inkubiert. Es konnten jedoch keine definierten Banden detektiert



**Abbildung 4.25: Pex3p-Komplexreinigung aus Überstand und Pellet der 1.UZ:** Von den Co-Immunpräzipitationen aus dem Überstand 1.UZ und aus dem Solubilisat wurden gleiche Mengen Pex3p auf ein SDS-Gel aufgetragen und die mitgereinigten Proteine im Westernblot nachgewiesen. (UZ = Ultrazentrifugation)

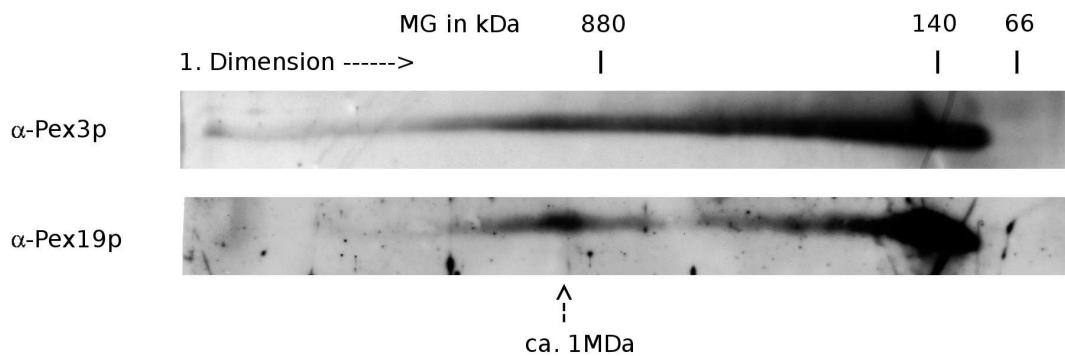
werden (nicht gezeigt). Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Komplexe nach nativer Auftrennung durch Blaue-Native-Gelelektrophorese denaturiert und in einer zweiten Dimension die Proteine des Komplexes über SDS-PAGE aufgetrennt (Methode s. Abschn. 3.5.4, S. 53). Die mit dem Komplex assoziierten Proteine wurden dann im Immunoblot detektiert. Unter Verwendung dieser Methode würde man distinkte punktförmige Färbungen entsprechend der Komplexgröße und der monomeren Proteingröße des nachgewiesenen Proteins erwarten.

Zur Größenbestimmung wurde in der nativen Gelelektrophorese ein geeigneter Marker mitgeführt und die Komplexe durch Anfärben mit Coomassie detektiert.

Nach Auftrennen des Eluats über die oben beschriebene zweidimensionale Gelelektrophorese konnte im Immunoblot des SDS-Gels Pex3p regelmäßig nur in einer Bande detektiert werden, die über die gesamte Breite des SDS-Gels verläuft (s. Abb. 4.26). Die erwartete punktförmige Färbung konnte nicht beobachtet werden. Im mit Pex19p-Antikörpern behandelten Immunoblot sah die Färbung vergleichbar aus, es konnte jedoch eine Verdickung der Bande im Molekulargewichtsbereich von 1 MDa nachgewiesen werden (s. Pfeilmarkierung in Abbildung 4.26 auf der nächsten Seite). Pex13p konnte im Immunoblot der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Da aus technischen Gründen der native Marker in den hier gezeigten Gelen nicht detektiert werden konnte, wurden die Positionen der Markerproteine von vergleichbaren Gelen übertragen.

Die Verteilung von Pex3p über einen Molekulargewichtsbereich von 100 bis 1000 kDa ist wahrscheinlich auf den Zerfall des Pex3p-Komplexes während der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese zurückzuführen.

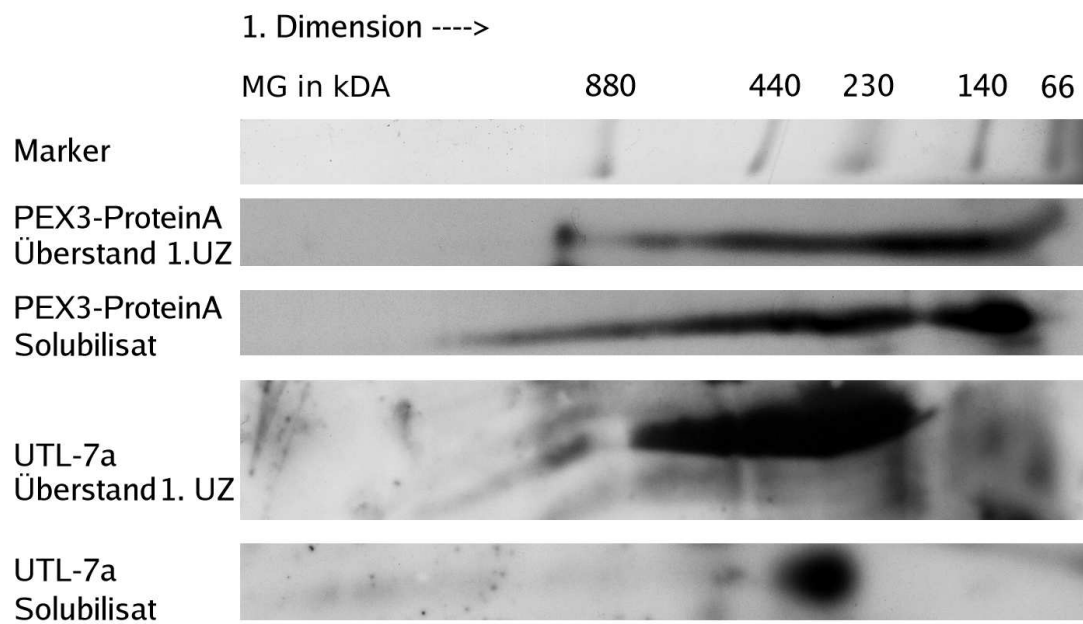


**Abbildung 4.26: Blaue-Native-Gelelektrophorese gereinigter Pex3p-Komplex:** Das Eluat einer Co-Immunpräzipitation wurde mit Ladebuffer versetzt über eine Blaue-Native-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Gelstreifen der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese wurde dann mit 1% SDS und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt und in ein SDS-Polyacrylamidgel eingebettet. Dargestellt sind die Immunoblots von zwei parallel behandelten Fraktionen eines Eluates. Die Laufrichtung der ersten Dimension ist durch einen Pfeil angedeutet. Der senkrechte Pfeil weist auf einen putativen Komplex hin. (MG = Molekulargewicht)

Die oben beschriebene zweidimensionale Gelelektrophorese wurde auch mit den ungereinigten Solubilisaten und mit den mit Digitonin versetzten Überständen der ersten Ultrazentrifugation durchgeführt. Hierbei konnten im Immunoblot mit ProteinA- und Pex3p-Antikörpern drei verschiedene Komplexe detektiert werden (s. Abb. 4.27 auf der nächsten Seite).

Der kleinste Komplex hatte eine Größe von ca. 100 kDa und könnte somit ein Dimer aus Pex3p-ProteinA (70 Da) und Pex19p (42 Da) darstellen. Es könnte sich aber auch um ein Pex3p-ProteinA-Monomer (70 kDa) handeln.

Der 100 kDa-Komplex konnte in den Proben des Wildtypstamms (UTL-7A) nicht detektiert werden. In diesen Proben hatte der kleinste Pex3p-Komplex eine Größe von ca. 250 kDa.



**Abbildung 4.27: Blaue-Native-Gelelektrophorese ungereinigter Solubilisate:** Der Überstand der ersten Ultrazentrifugation wurde mit 1% Digitonin versetzt und anschließend über eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit Blauer-Nativer-Gelelektrophorese als erster Dimension aufgetrennt. Membransolubilisate wurden entsprechend behandelt. Die Proteine wurden im Immunoblot mit anti-ProteinA-Antikörper (*PEX3*-ProteinA Stamm) bzw. mit Antikörpern gegen das endogene Pex3p (UTL-7a) detektiert. (MG = Molekulargewicht)

In den Überständen der ersten Ultrazentrifugation wurde ein Komplex detektiert, der Größer als 880 kDa war. Dieser konnte in den Membransolubilisaten nicht nachgewiesen werden.

Bei allen Proben überwog der Anteil an kleinen Komplexen. Pex3p wurde außerdem in einer durchgehenden Bande detektiert, die einem Größenbereich des nativen Gels von >880 kDa bis 100 kDa (bei Wildtypproben bis 250 kDa) entsprach. Es ist daher anzunehmen, dass der Komplex während der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese zerfällt.

Eine Kolo-kalisation von Pex3p in Komplexen mit Pex13p oder Pex19p konnte in Solubilisaten nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies könnte unter anderem auf eine Überlagerung der Pex13p- und Pex19p-Signale durch Kreuzreaktionen der Antikörper in den ungereinigten Proben zurückzuführen sein.

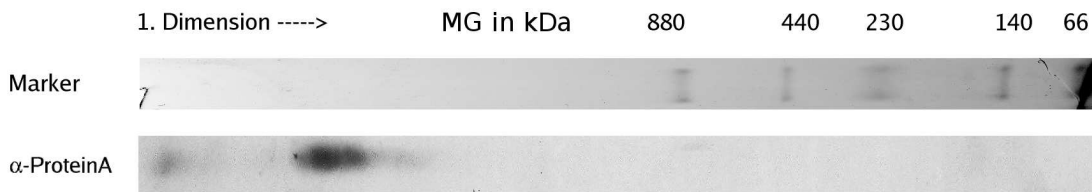
#### 4.3.4 Vernetzungsexperimente

Vernetzungsexperimente werden durchgeführt, um Komplexzusammensetzungen zu bestimmen oder Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Vernetzung von Proteinen dazu verwendet werden, die in der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese von nicht vernetzten Proben nur schwer detektierbaren größeren Pex3p-Komplex zu stabilisieren. Dazu wurden Membransolubilisate mit dem homobifunktionellen, cysteinreaktiven Vernetzerreagenz DTME versetzt (Durchführung s. Abschn. 3.5.7, S. 55). DTME ist durch DTT oder Mercaptoethanol spaltbar, was eine Auftrennung des Komplexes in die monomeren Proteinebestandteile in der zweiten Dimension der Gelelektrophorese ermöglicht.

Die Proben wurden nach Vernetzung mit DTME über die in Abschnitt 4.3.3 beschriebene zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und die Pex3p-Verteilung im Immunoblot detektiert. Wie in Abbildung 4.28 auf der nächsten Seite zu erkennen ist, konnte unter Verwendung von 3mM DTME eine deutliche punktförmige Färbung detektiert werden. Die Größe des zugehörigen Komplexes wurde durch Extrapolation der vorhandenen Größenstandards auf 6 bis 7MDa geschätzt.

Da der durch Vernetzung detektierte Komplex nicht in unvernetzten Proben nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob durch zu hohe Konzentration des Vernetzerreagenzes eine artifizielle Vernetzung mehrerer Komplexe bewirkt wurde. Deshalb wurde das Experiment mit einer Vernetzerkonzentration





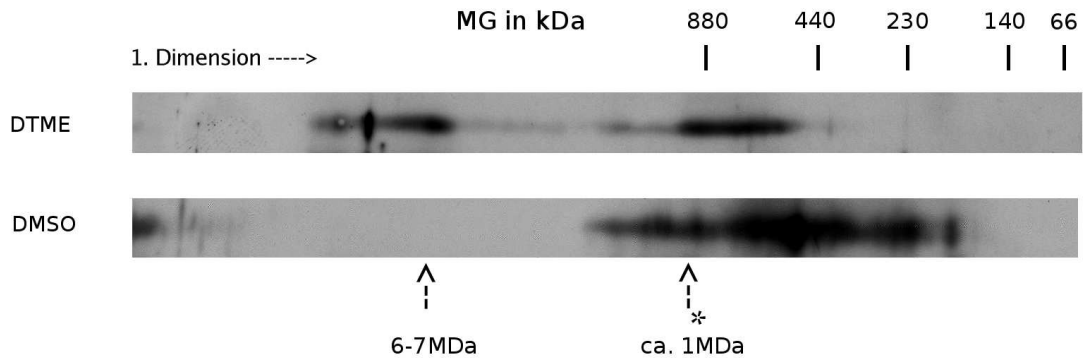
**Abbildung 4.28: Blaue-Native-Gelelektrophorese vernetzter Solubilisate:** Das Solubilisat wurde mit einer Endkonzentration von 3mM DTME zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Proben anschließend über zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen ProteinA. Die Proteine im Markerstreifen des Blauen-Nativen Geles wurden mit Coomassie angefärbt. (MG = Molekulargewicht)

von 30 $\mu$ M wiederholt. Unter diesen Bedingungen konnten zwei Komplexe detektiert werden (s. Abb. 4.29). Der größere Komplex entspricht dem nach Behandlung mit 3mM DTME beobachteten Komplex. Der kleinere Komplex entspricht dem in unvernetzten Proben detektierbaren Komplex (s. Abb. 4.27) mit einer Größe von ca. 1MDa. Das Signal ist jedoch breiter als die in unvernetzten Proben beobachtete Färbung.

Da das Vernetzerreagenz in DMSO gelöst wird, wurden die Proben zur Kontrolle mit DMSO behandelt. Hier kann die bei unbehandelten Proben beobachtete durchgehende Bande beobachtet werden (s. Abb. 4.27). Jedoch verläuft die Bande nicht über das gesamte Gel sondern endet auf einer Komplexgröße von ca. 200kDa. (Da der Marker nicht abgebildet werden konnte, wurden die Markerpositionen manuell übertragen.)

### 4.3.5 Pex3p im Cytosol?

Wie in Abbildung 4.23 auf Seite 91 gezeigt wurde, konnte im Überstand der ersten Ultrazentrifugation Pex3p-ProteinA detektiert werden. Da in dieser Fraktion nur lösliche Proteine zu finden sein sollten und Pex3p ein integrales Membranprotein ist, war dieses Ergebniss überraschend. In Zellaufschlüssen des Wildtyps UTL-7A konnte endogenes Pex3p nicht im Überstand der ersten Ultrazentrifugation detektiert werden (s. Abb. 4.30). Da der Protein A-Anteil des Pex3p-Protein A Fusionsproteins unspezifisch an IgGs bindet, kann Pex3p-Protein A jedoch besser detektiert werden als endogenes Pex3p. Es ist daher möglich, dass auch in



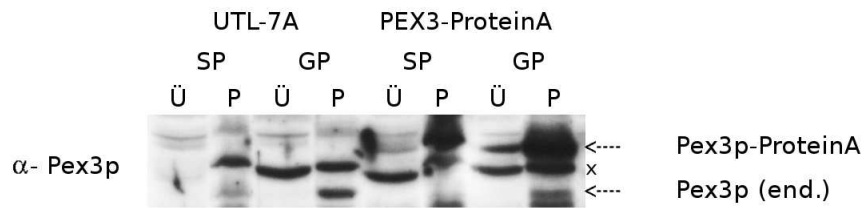
**Abbildung 4.29: Blaue-Native-Gelelektrophorese vernetzter Solubilisate:** Die Solubilisate wurden entweder mit  $30\mu\text{M}$  DTME oder 10% DMSO versetzt und über zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden mit einem Antikörper gegen ProteinA im Immunoblotdetektiert. Der mit \* markierte Pfeil weist auf den auch in den unvernetzten Proben nachweisbaren Komplex hin. (MG = Molekulargewicht)

Wildtypzellen Pex3p im cytosolischen Überstand vorhanden ist.

In den Pex3p-ProteinA-Zellaufschlüssen ist Pex3p deutlich im cytosolischen Überstand detektiertbar. Die Existenz von Pex3p-ProteinA ist dabei unabhängig von der Aufschlussmethode (s. Abbildung 4.30 auf der nächsten Seite).

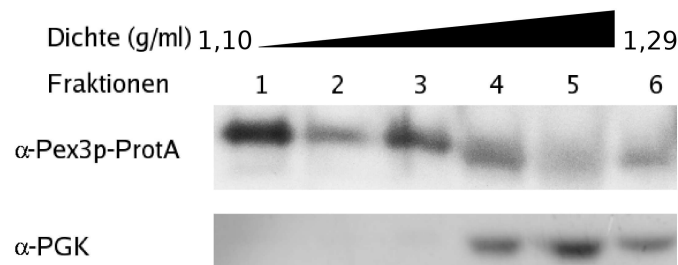
Um zu klären, ob das im Überstand der ersten Ultrazentrifugation detektierbare Pex3p neu synthetisiertes, lösliches Pex3p oder Pex3p in sehr kleinen Membranstrukturen ist, wurde eine Floatationsgradientenzentrifugation durchgeführt. Bei der Floatationsgradientenzentrifugation werden die Proben auf eine Dichte von  $1.26\text{g/ml}$  gebracht und über eine Saccharoselösung der Dichte  $1,31\text{g/ml}$  geschichtete. Danach wird die Probe mit einem Saccharosestufengradienten überschichtet und der Gradient bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert (Durchführung s. Abschn. 3.5.6, S. 55). Wie bei dem in Abschnitt 4.2.1 auf Seite 79 beschriebenen Saccharosegradienten erfolgt die Trennung der Komponenten nach ihrer Dichte. Da die Proben jedoch unter den Gradienten geschichtet werden, bleiben lösliche Proteine – im Gegensatz zur Saccharosegradientenzentrifugation – am Boden des Gradienten. Membrangebundene Proteine floatieren auf Grund der durch die Lipide verringerten Dichte der Partikel zu dem weniger dichten Bereich des Gradienten.

Der in Abbildung 4.31 dargestellte Floatationsgradient zeigt deutlich, dass



**Abbildung 4.30: Vorkommen von Pex3p im Überstand der 1.UZ abhängig von der Aufschlussmethode:** Zellen der Stämme UTL-7A und *PEX3*-ProteinA wurden entweder mit Glasperlen (GP) oder nach Spheroplastierung (SP) mit Spritze und Kanüle aufgeschlossen (Durchführung s. Abschn. 3.5.5, S. 54). Die daraus resultierenden zellfreien Homogenate wurden bei 200.000g für 30 Minuten zentrifugiert. Von Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden gleiche Teile auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Verteilung des Pex3p mit Antikörpern gegen das endogene (end.) Protein im Immunoblot detektiert.

das im Überstand der ersten Ultrazentrifugation nachzuweisende Pex3p-ProteinA membranassoziiert ist. Pex3p-ProteinA konnte zum größten Teil in der Fraktion mit der geringsten Dichte nachgewiesen werden. Das cytosolische Protein Phosphoglyceratkinase (PGK) ist hingegen nur in den Fraktionen hoher Dichte nachweisbar.



**Abbildung 4.31: Floatationsgradient des Pex3p aus dem Überstand der 1. UZ:** Der Überstand der ersten Ultrazentrifugation wurde wie in Abschnitt 3.5.6 (S. 55) beschrieben behandelt. Der Floatationsgradient wurde in 6 Fraktionen portioniert und die Verteilung von Pex3p-ProteinA und Phosphoglyceratkinase (PGK) im Immunoblot untersucht.