

**Untersuchungen zur Funktion von Pex8p im
peroxisomalen Matrixproteinimport der Hefe
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie
der Freien Universität Berlin
angefertigt am
Institut für Biochemie

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Kerstin Schulz
aus Herne

Berlin 2003

Erster Gutachter: Herr Prof. Dr. R. Erdmann

Zweiter Gutachter: PD Dr. M. Ziegler

Datum der Disputation: 11.02.2004

Veröffentlichungen:

Brian V. Geisbrecht, Dai Zhu, Kerstin Schulz, Katja Nau, James C. Morrell, Michael T. Geraghty, Horst Schulz, Ralf Erdmann, and Stephen J. Gould (1998) Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase. Journal of Biological Chemistry 273 (50), 33184-33191

Brian V. Geisbrecht, Kerstin Schulz, Katja Nau, Michael T. Geraghty, Horst Schulz, Ralf Erdmann, and Stephen J. Gould (1999) Preliminary Characterization of Yor180Cp: Identification of a Novel Peroxisomal Protein of *Saccharomyces cerevisiae* involved in Fatty Acid Metabolism. Biochemical and Biophysical Research Communications 260, 28-34

Poster:

Kerstin Schulz, Lejla Hodzic, Ralf Erdmann
Characterisation of the Pex8p-Pex5p interaction.
ELSO, 2002, Nizza

Meetings:

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

European Life Scientist Organization, ELSO, 2002, Nizza

Stipendien:

2002-2003 Stipendium der Sonnenfeld-Stiftung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biogenese von Peroxisomen	4
1.2	Proteinimport in Peroxisomen	6
1.2.1	Signalsequenzen	7
1.2.2	PTS1.....	7
1.2.3	PTS2.....	7
1.2.4	PTS3 und andere Importsignale	8
1.2.5	mPTS.....	8
1.2.6	Rezeptoren	9
1.2.7	PTS1-Rezeptor	9
1.2.8	PTS2-Rezeptor	10
1.2.9	Modell 1 (shuttle model).....	10
1.2.10	Modell 2 (extended shuttle model)	10
1.2.11	Peroxisomales Docking	11
1.2.12	Translokation und Dissoziation	12
1.2.13	Rezeptor-Recycling	13
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Chemikalien.....	16
2.2	Geräte	17
2.3	Mikroorganismen	18
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.4	Antiseren	19
2.5	Vektoren und Plasmidkonstrukte.....	20
2.5.1	Vektoren	20
2.5.2	Plasmidkonstrukte	20
2.5.3	Oligonukleotide	22
2.6	Analytische Methoden	23
2.6.1	Bestimmung von Enzymaktivitäten	23
2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	23
2.6.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23

2.7	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.7.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> zur DNA-Isolierung	23
2.7.2	Präparation elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	24
2.7.3	Präparation CaCl ₂ -kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	24
2.7.4	Transformation elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	25
2.7.5	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen	25
2.7.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	25
2.7.7	DNA-Restriktion	26
2.7.8	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.7.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	27
2.7.10	Alkalische Phosphatase-Behandlung	27
2.7.11	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.7.12	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	27
2.7.13	Ungerichtete Mutagenese von <i>PEX8</i> mit Hilfe der fehleranfälligen PCR-Methode	28
2.7.14	Gerichtete Mutagenese von <i>PEX8</i>	29
2.7.15	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.7.16	Präparation chemisch kompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Transformation	30
2.7.17	Präparation elektrokompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Transformation	31
2.8	Protein-Biochemische Methoden	31
2.8.1	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	31
2.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.8.3	Western Blotting und Immundetektion.....	33
2.9	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.9.1	Medien und Wachstumsbedingungen	34
2.9.2	Dauerkulturen.....	35
2.9.3	Ölsäure-Wachstumstest.....	35
2.9.4	Anzucht für biochemische Analysen.....	35
2.9.5	Anzucht zur mikroskopischen Analyse.....	35
2.10	Zellaufschluss nach Yaffe und Schatz.....	36
2.11	Herstellung des Post-Nuklearen Überstandes	36
2.12	Sedimentation von Organellen durch differentielle Zentrifugation ..	37

2.13	Fraktionierung von Organellen durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	37
2.14	Fraktionierung von Organellen durch Flotationsgradienten-Zentrifugation	38
2.15	Limitierte Proteolyse von Zellorganellen	38
2.16	Analyse zur Membranassoziation von Pex8p	39
2.17	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	39
2.18	Hefe Two-Hybrid-Methoden	40
2.18.1	β-Galaktosidase Filterttest und Wachstumstest	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Das Hefe Two- Hybrid-System	41
3.1.1	Einführung	41
3.1.2	Funktionsweise des Two-Hybrid-Systems	42
3.1.3	Limitierungen des Gal4p-basierenden Two-Hybrid-Systems	43
3.1.4	In dieser Arbeit verwendete Systeme	44
3.2	Mit welchen peroxisomalen Proteinen interagiert Pex8p?	45
3.3	Herstellung von Verkürzungskonstrukten zur Identifizierung der Bindebereiche von Pex8p zu Pex5p, Pex7p und Pex14p	47
3.4	Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex5p	48
3.5	Identifizierung des Bindebereiches von Pex5p zu Pex8p	49
3.6	Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex7p	50
3.7	Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex14p	51
3.8	Sind die Interaktionen zwischen Pex8p und Pex5p, Pex7p und Pex14p direkt oder indirekt?	51
3.9	Pex8p interagiert mit sich selbst	54
3.10	Identifikation des Bindebereiches von Pex8p zu Pex5p durch Two-Hybrid-Analyse	56
3.10.1	Ungerichtete Mutagenese von Pex8p durch fehleranfällige PCR	56
3.10.2	Sequenzanalyse der Pex8pM-Proteine, die nicht mehr mit dem Rezeptorprotein Pex5p interagieren	59
3.10.3	Einführung und Analyse von Einzelmutationen in <i>PEX8</i>	63
3.10.4	Two-Hybrid-Analyse der Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P)	63
3.10.5	Komplementationsanalyse der Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) in UTL-7A <i>pex8Δ</i>	65

3.10.6	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Import von PTS1- und PTS2-Proteinen in Peroxisomen in Anwesenheit der Proteine Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P)	66
3.11	Wie gelangt Pex8p an die peroxisomale Membran?	68
3.11.1	Dichtegradientenzentrifugation	68
3.11.2	Flotation	74
3.12	Limitierte Proteolyse von Pex8p-ProtA in UTL-7A und den Mutanten UTL-7A <i>pex5</i> Δ und UTL-7A <i>pex7</i> Δ	79
3.13	Analyse der Membranassoziation von Pex8p-ProtA in den Mutanten UTL-7A <i>pex5</i> Δ , UTL-7A <i>pex7</i> Δ und im Wildtypen UTL-7A	82
4	Diskussion	85
4.1	Die verschiedenen Interaktionspartner von Pex8p	85
4.2	Einengung der Interaktionsbereiche von Pex8p zu den identifizierten Peroxinen	87
4.3	Die Abhängigkeit der Interaktionen zwischen Pex8p und Pex5p, Pex7p und Pex14p von anderen Peroxinen	88
4.4	Die Mutationsanalyse von Pex8p	90
4.5	Erfolgt das Targeting von Pex8p über die Rezeptoren Pex5p und Pex7p?	96
5	Zusammenfassung	99
6	Abstract	101
7	Literatur	103
8	Anhang	121
8.1	Abkürzungen	121