

3 Ergebnisse

3.1 Das Hefe Two- Hybrid-System

3.1.1 Einführung

Auf Protein-Protein Interaktionen liegt ein Fokus der Forschung, da sie die Basis vieler biochemischer Reaktionen bilden und Einsichten über ihre Regulation und Funktion somit elementar sind. Da ein methodischer Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem Hefe Two-Hybrid-System liegt, wird im Folgenden das eingesetzte System kurz vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid-Systems Interaktionsstudien mit den Peroxinen Pex8p und Pex4p durchgeführt. Dieses von Fields und Song veröffentlichte genetische System zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen (59) macht sich folgendes Schlüsselergebnis zunutze:

Brent und Ptashne konnten zeigen, dass es möglich war einen hybriden Transkriptionsaktivator aus dem LexA Repressor von *E. coli* und dem Hefe Gal4-Protein zu konstruieren (18).

Im Vergleich zu biochemischen Methoden zur Erforschung von Protein-Protein Interaktionen basiert das Two-Hybrid-System auf einem genetischen Ansatz, in dem die Interaktion zweier Proteine auf der Rekonstitution eines funktionellen Transkriptionsaktivator beruht (25, 59). Diese Methode erlaubt die Identifikation von miteinander interagierenden Proteinen genauso wie die Eingrenzung der dazu notwendigen oder ausreichenden Domänen oder Aminosäuren (124). Neu identifizierte Bindepartner eines Proteins mit bekannter Funktion können die Prozesse durchleuchten, in welche die Proteinpartner involviert sind. Genauso kann aber die Funktion eines Proteins unklar sein, obwohl das fehlerfreie Funktionieren des Organismus von seiner Anwesenheit abhängt. Dann können neue oder bekannte Interaktionspartner mit bekannter Funktion neue Anhaltspunkte für die jeweilige Funktion des Proteins liefern. Mittlerweile wurde das ursprüngliche Hefe Two-Hybrid-System vielfach verändert und ist zu einem kraftvollen Instrument in vielen Bereichen der Biologie und Biochemie geworden. Beispiele hierfür sind verwandte Methoden wie das One-Hybrid-System (244), welches u.a. die Analyse von Protein-DNA Interaktionen ermöglicht und das Three-Hybrid-System (179) zur Untersuchung von Protein-RNA Interaktionen. Eine weitere Entwicklung ist das Split-Ubiquitin-System, durch das Protein-

Protein Interaktionen zeit- und ortsabhängig untersucht werden können (104). Trotz mittlerweile vieler verschiedener Ausführungen des Two-Hybrid-Systems wird diese Einleitung sich auf die Beschreibung des Gal4p-basierenden Systems beschränken, da dieses ausschließlich in dieser Arbeit Verwendung gefunden hat.

3.1.2 Funktionsweise des Two-Hybrid-Systems

Die Basis dieses Systems beruht auf der strukturellen Besonderheit bestimmter Transkriptionsfaktoren, zwei physikalisch trennbare Domänen zu besitzen, eine DNA-bindende Domäne und eine transkriptionsaktivierende Domäne. Die DNA-Bindedomäne dient der zielgerichteten Positionierung des Transkriptionsfaktors an spezifische Promotorsequenzen, bezeichnet als UAS („upstream activation sequences“). In spezifisch konstruierten Two-Hybrid-Hefestämmen wird die Transkription der codierenden Sequenz eines Reportergens von diesen UAS gesteuert. Die Aktivierungsdomäne erleichtert die Assemblierung des Transkriptionskomplexes und somit die Initiation der Transkription. Die voneinander getrennt exprimierten Domänen interagieren nicht mehr miteinander. Der Transkriptionsfaktor ist dann nicht funktionell und somit nicht in der Lage, ein Reportergen zu aktivieren. Die Rekonstitution eines funktionellen Transkriptionsfaktors durch nicht kovalente Interaktion von zwei unabhängigen Hybridproteinen, bestehend jeweils aus der DNA-Bindenden-Domäne und einem Protein X bzw. der Transkriptionsaktivierenden Domäne und einem Protein Y, ermöglicht die Transkription definierter Reportergene (*lacZ*, *HIS3*, *ADE2*). Deren Genprodukte sind mit Hilfe verschiedener Verfahren messbar. Enzymatisch-colorimetrische Verfahren verwenden verschiedene Substrate wie z.B. X-Gal zur Messung der Reportergenaktivität. Wachstumstests auf definierten Nährmedien (SD-Medium, engl. „synthetic dropout“, Minimalmedium) nutzen verschiedene Auxotrophien der jeweiligen Two-Hybrid-Hefestämme (39). Hierbei wurde die Spezifität der Interaktionen durch die simultane Verwendung von zwei verschiedenen Reportergenen mit minimalen Sequenzüberlappungen in ihren Promotorregionen erheblich verbessert (8, 39). Daher wurden auch innerhalb dieser Arbeit die Reportergene *HIS3* und *ADE2* des Stammes PJ69-4a gleichzeitig genutzt. Normalerweise sind die Fusionsproteine allein jeweils nicht in der Lage die Transkription zu aktivieren, sondern benötigen immer den jeweiligen Protein-Interaktionspartner. Von einer Autoaktivierung spricht man daher, wenn die Aktivierung des Reportergens durch nur ein Hybridprotein erfolgt und damit eine

weitere Analyse der Protein-Protein Interaktionen mit diesem Hybridprotein nicht möglich ist. Die mechanistischen Vorgänge, wie diese Falsch-Positiven Signale entstehen, sind nicht geklärt. Eines der in dieser Arbeit verwendeten Reportergene ist die *HIS3* codierte Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase. 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) ist ein Inhibitor dieses Enzyms, dessen Basalexpression vom Reporterkonstrukt für das Wachstum der Hefezellen auf SD_H Selektionsmedium notwendig ist. Zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen der jeweiligen Hybridproteine durch Wachstumsmerkmale der Hefezellen auf SD_{-WLH} muss diese Basalexpression jedoch unterdrückt werden. Dazu werden in der Literatur beschriebene, stammspezifische 3-AT Konzentrationen verwendet (216).

3.1.3 Limitierungen des Gal4p-basierenden Two-Hybrid-Systems

Häufig limitierende Faktoren des Gal4p basierenden Hefe Two-Hybrid-Systems sind bereits erwähnte Falsch-Positive Signale verschiedener Hybridkonstrukte. Desweiteren sind exprimierte Hybridproteine für die Zellen häufig toxisch, da sie essentielle zelluläre Funktionen beeinträchtigen können. Dieser Effekt ist nur über die Verwendung von „low-copy“ Plasmiden, induzierbaren Systemen oder verkürzte und damit gleichzeitig in ihrer Toxizität herabgesetzte Hybridproteine abzuschwächen. Weiterhin ist die Untersuchung von Proteinen, die selbst eine Transkriptionsaktivierungskapazität besitzen, nicht möglich. Ebenfalls kann sich die Notwendigkeit der nukleären Lokalisation der Hybridproteine für einige Membranproteine, aber auch cytoplasmatische oder extrazelluläre Proteine nachteilig auswirken. Desweiteren ist *Saccharomyces cerevisiae* nicht zu allen eventuell für höhere Eukaryoten notwendigen Proteinmodifikationen in der Lage. Auch muss die im Hefe Two-Hybrid-System beobachtete Interaktion nicht unbedingt eine physiologisch relevante Interaktion widerspiegeln, wenn z.B. Proteine in unterschiedlichen Geweben, subzellulären Kompartimenten oder Entwicklungsstadien des jeweiligen Organismus lokalisiert sind. Mittels des Two-Hybrid-Systems identifizierte Interaktionen müssen nicht notwendiger Weise direkt sein, sondern können durch eine weitere Komponenten vermittelt werden, sodass weiterführende Studien über die Art der Interaktion notwendig sind.

3.1.4 In dieser Arbeit verwendete Systeme

Die Sequenzen für die jeweiligen Domänen des Gal4p werden von zwei verschiedenen Vektoren codiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren pPC97 (Gal4p-BD) und pPC86 (Gal4p-AD) besitzen weitere wichtige Strukturmerkmale von sogenannten Wechselvektoren („Shuttle Vektoren“). Dazu gehören Replikationsursprungspunkte zur Vermehrung der Vektoren sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *E. coli*, sowie Selektionsmarker zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation in den jeweiligen Organismus. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation beider Plasmide in *Saccharomyces cerevisiae* werden die Selektionsmarker *LEU2* und *TRP1* eingesetzt, deren Genprodukte in der Biosynthese der jeweiligen Aminosäuren essentiell sind. In Abbildung 3.1 sind die Komponenten des verwendeten Hefe-Two-Hybrid-Systems schematisch dargestellt.

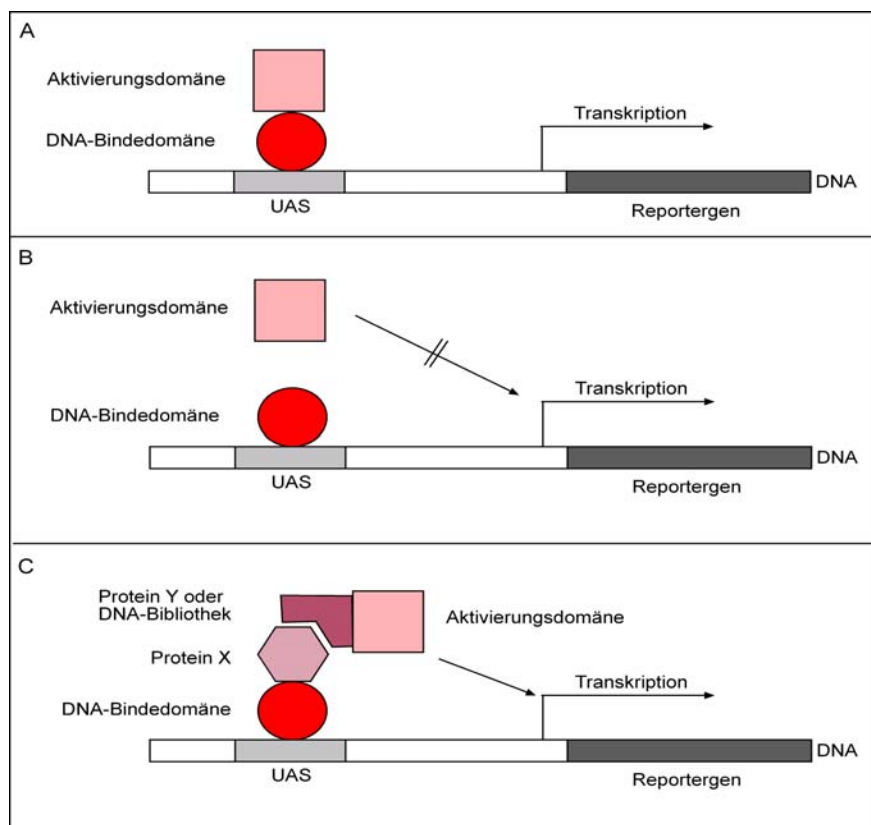


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Hefe Two-Hybrid-Systems

(A) Der schematisch dargestellte Transkriptionsfaktor besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen. Die DNA-Bindungsdomäne positioniert den Faktor durch Bindung an die UAS (Upstream-Aktivatorsequenz) in der Umgebung einer Transkriptionseinheit, während die Aktivierungsdomäne mit Proteinen des basal Transkriptionsapparats interagiert und somit die Transkription aktiviert.

(B) Die physische Entkopplung der Aktivierungsdomäne von der DNA-Bindungsdomäne führt zu Funktionsverlust.

(C) Die funktionalen Domänen eines Transkriptionsfaktors sind auf zwei Fusionsproteinen exprimiert. Seine Funktion wird wieder hergestellt, wenn die Fusionsproteine über die zusätzlichen Fusionsanteile interagieren (modifiziert nach Bioanalytik, Lottspeich und Zorbas (130)).

3.2 Mit welchen peroxisomalen Proteinen interagiert Pex8p?

ScPex8p wird in Rehling *et al.* als für die Peroxisomenbiogenese notwendiges, intraperoxisomales peripheres Membranprotein beschrieben, das ein PTS1- und eventuell ein PTS2-Signal besitzt (171). Der Rezeptor für PTS1-Proteine Pex5p interagiert mit Pex8p, unabhängig von dessen C-terminalem PTS1-Signal. Pex8p ist ebenfalls Komponente eines multimeren Komplexes, bestehend aus den Peroxinen der Docking-Maschinerie (Pex13p, Pex14p und Pex17p) und den Zink-Finger-Proteinen (Pex2p, Pex10p und Pex12p) und notwendig für die Bildung eines funktionsfähigen Importomers (2). Diese Arbeit fokussiert sich auf Interaktionen von Pex8p mit Komponenten des Rezeptor-/Docking-Komplexes und der Analyse der damit einhergehenden Funktionen. Daher galt es zunächst zu klären, mit welchen Proteinen des Rezeptor-/Docking-Komplexes Pex8p interagiert. Dazu wurden die in verschiedene Two-Hybrid-Vektoren klonierten peroxisomalen Proteine, unter anderem Pex5p, Pex7p, Pex13p, Pex14p, und Pex17p auf ihre Interaktionsfähigkeit mit Pex8p getestet (siehe Tab. 3.1). Abbildung 3.2 zeigt die identifizierten Interaktionspartner von Pex8p.

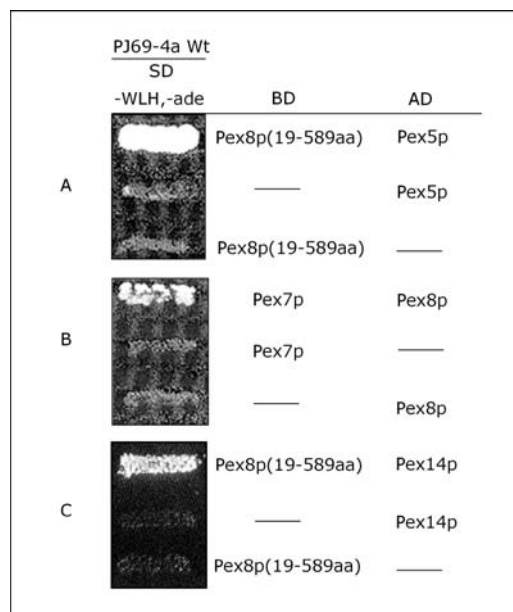


Abb. 3.2 Two-Hybrid-Untersuchung zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von Pex8p aus Peroxinen des Rezeptor-/Docking-Komplexes

Transformanten des Stammes PJ69-4a wurden auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reportergenaktivität untersucht. A) Pex8p (19-589 aa) interagiert mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p. B) Pex8p interagiert mit dem PTS2-Rezeptor Pex7p. C) Pex8p (19-589 aa) interagiert mit dem peroxisomalen Membranprotein Pex14p. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, -: Vektor ohne Fremd-DNA, SD: Minimalmedium

Zusätzlich zu der bekannten Interaktion zwischen Pex8p und Pex5p interagiert Pex8p mit Pex7p, dem Importrezeptor für PTS2-haltige peroxisomale Matrixproteine. Mit Pex14p ist ebenfalls eine neue Komponente der membranständigen Dockingmaschinerie als Interaktionspartner identifiziert. Dieses Ergebnis deckt sich mit Komplexuntersuchungen, in denen Pex8p Teil eines Komplexes verschiedener peroxisomaler Proteine ist, dem auch Pex14p angehört (2). Tabelle 3.1 fasst die Auswahl der auf Interaktion zu Pex8p getesteten peroxisomalen Proteine zusammen.

Tab. 3.1 Auf Interaktion zu Pex8p getestete Peroxine

AD	BD										
	Pex5p	Pex6p	Pex7p	Pex10p	Pex11p	Pex12p [1]	Pex13p SH3 [2]	Pex13p [3]	Pex14p	Pex17p	Fox3p
Pex8p	*	-	+	-	-	-	-	n.g.	*	-	-
Pex8p(19-589 aa)	+	-	*	-	-	-	n.g.	-	+	-	-
BD	Pex5p	Pex6p	Pex7p	Pex10p	Pex11p	Pex12p [1]	Pex13p SH3 [2]	Pex13p [3]	Pex14p	Pex17p	Fox3p
	AD										

- = keine Interaktion, + = Interaktion, * = Autoaktivierung, n.g. = nicht getestet; BD = DNA-Bindedomäne, TA = Transkriptionsaktivierende Domäne; [1] Pex12p C-Terminus, [2] = Pex13p SH3-Domäne aus Girzalsky *et al.* (74), [3] = Pex13p Gesamt- und Verkürzungsstrukturen aus Stein *et al.* (191)

Pex13p, wie Pex14p ebenfalls Komponente der peroxisomalen Docking-Maschinerie und auch Teil dieses Komplexes, konnte im Unterschied zu Deckers (34) in dieser Two-Hybrid-Untersuchung nicht als Interaktionspartner von Pex8p identifiziert werden. Bereits aus anderen Two-Hybrid-Untersuchungen ist bekannt, dass Verkürzungen von Pex13p besser mit den Rezeptoren interagieren, als das gesamte Pex13-Protein (74, 191). Vermutlich sind hierfür die beiden Transmembrandomänen des Proteins verantwortlich. Aus diesem Grund wurden zur Interaktion zwischen Pex8p und Pex13p ebenfalls Teilbereiche von Pex13p getestet. Allerdings interagieren die Verkürzungsfragmente von Pex13p nicht mit Pex8p. Auch Pex17p, ein weiteres Protein der Docking-Maschinerie interagiert nicht mit Pex8p (Daten nicht gezeigt). Da peroxisomale Matrixproteine rezeptorabhängig importiert werden und Pex8p in der Lage ist, mit beiden Rezeptoren zu interagieren, stellte sich die Frage, ob Pex8p an die Cargoproteine binden kann. Dazu wurde die Interaktion zwischen Pex8p und Fox3p getestet. Es konnte aber keine Interaktion mit Fox3p, dem PTS2-haltigen Cargoprotein, welches von Pex7p an die peroxisomale Membran dirigiert wird,

nachgewiesen werden. Dies korreliert mit Untersuchungen, in denen ein fluoreszenzmarkiertes PTS1-Peptid als Cargoprotein spezifisch mit *HpPex5p* und nicht mit *HpPex8p* interagiert (231).

3.3 Herstellung von Verkürzungsstrukturen zur Identifizierung der Bindebereiche von Pex8p zu Pex5p, Pex7p und Pex14p

Zur näheren Charakterisierung des von Pex8p zur Interaktion mit Pex5p, Pex7p und Pex14p notwendigen Bereiches, wurden vier Verkürzungsstrukturen von Pex8p hergestellt und in die Two-Hybrid-Vektoren kloniert. Pex8p/KS1 umfasst den Bereich der Aminosäuren 19-293 aa, Pex8p/KS2 den Bereich 293-586 aa von Pex8p. Die Verkürzungsstrukturen Pex8p/KS3 (19-440 aa) und Pex8p/KS4 (146-586 aa) sind jeweils um ein Drittel des Proteins verkürzt. In Abbildung 3.3 sind diese vier Verkürzungsstrukturen, sowie verschiedene Motivvorschläge unterschiedlicher *in silico*-Analysen des Proteins Pex8p graphisch dargestellt.

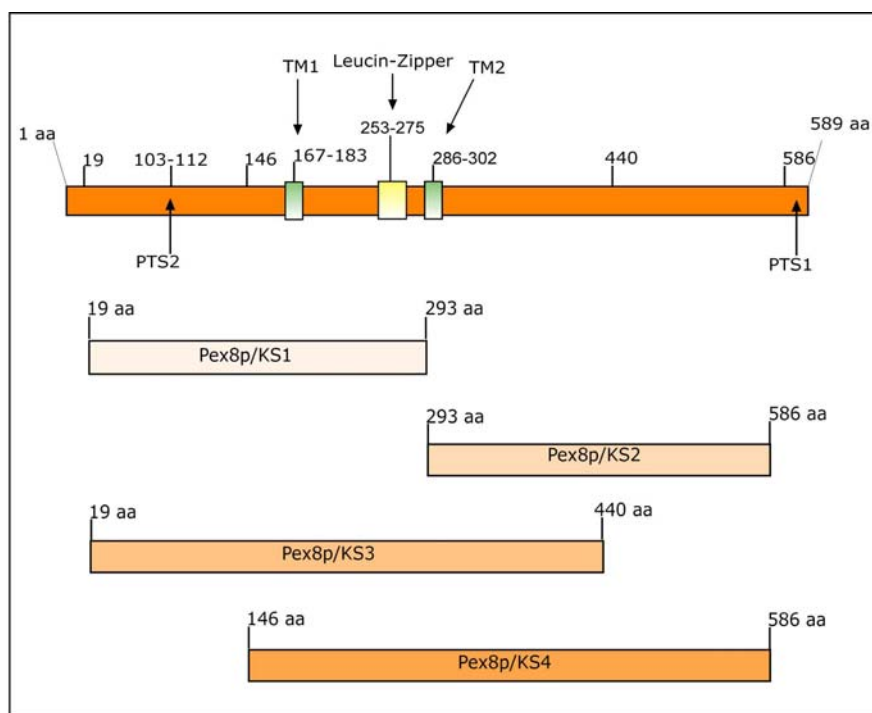


Abb. 3.3 Graphische Darstellung der Verkürzungsstrukturen von Pex8p

Pex8p/KS1 (19-293 aa), Pex8p/KS2 (293-586 aa), Pex8p/KS3 (19-440 aa) und Pex8p/KS4 (146-586 aa) im Vergleich zu Pex8p. Dargestellt sind Motivvorschläge unterschiedlicher *in silico* Analysen von Pex8p. PTS1 und PTS2 = Peroxisomale Zielsteuerungssequenz 1 und 2 (nach NSP@ (149)), Leucin-Zipper (nach PSORTII (164)), TM1 und TM2 = Transmembrandomäne 1 und 2 (nach PSORTII (164)): Die Existenz der Transmembrandomänen entspricht nicht der beschriebenen intraperoxisomalen, peripheren Lokalisation des Proteins (171).

3.4 Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex5p

Mit Hilfe der Two-Hybrid-Analyse wurde überprüft, welche der unter Abbildung 3.3 dargestellten vier Konstrukte weiterhin mit Pex5p interagieren. Dazu wurde der Two-Hybrid-Stamm PJ69-4a mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und die Reporterogenaktivität durch Wachstumstests der Transformanten auf geeignetem SD-Medium getestet.

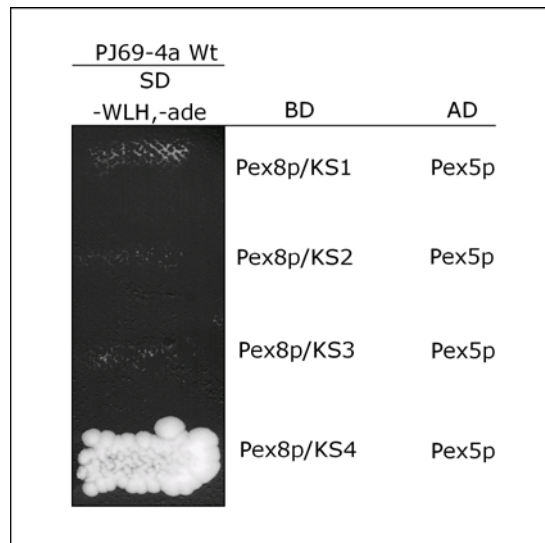


Abb. 3.4 Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex5p

Die Interaktionen zwischen Pex8p/KS1 (19-293 aa), Pex8p/KS2 (293-586 aa), Pex8p/KS3 (19-440 aa), Pex8p/KS4 (146-586 aa) und Pex5p wurden untersucht. Transformanten des Stammes PJ69-4a wurden auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reporterogenaktivität getestet. Pex8p/KS4 (146-586 aa) interagiert mit Pex5p. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Pex5p interagiert von allen getesteten Verkürzungskonstrukten von Pex8p nur mit Pex8p/KS4 (146-586 aa).

3.5 Identifizierung des Bindebereiches von Pex5p zu Pex8p

Zur Eingrenzung des Bindebereiches des PTS1-Rezeptors Pex5p zu Pex8p, erfolgte eine Two-Hybrid-Interaktionsstudie von Verkürzungskonstrukten von Pex5p (162) mit Pex8p. Dazu wurde der Two-Hybrid-Stamm PJ69-4a mit den geeigneten Plasmiden transformiert und nachfolgend die Reporterogenaktivität durch Wachstumstests der Transformanten auf geeignetem SD-Medium bestimmt. In Abbildung 3.5 ist diese Interaktionsstudie dargestellt.

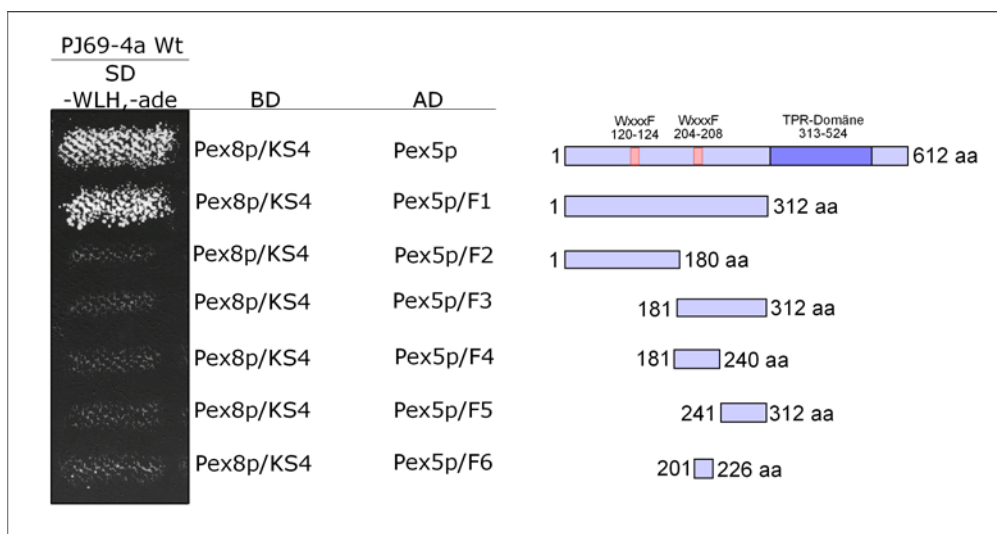


Abb. 3.5 Identifizierung des Bindebereiches von Pex5p zu Pex8p

Transformanten des Stammes PJ69-4a wurden auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reporterogenaktivität untersucht. Pex5p und Pex5p/F1 (1-312 aa) interagieren mit Pex8p/KS4 (146-586 aa). BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Sowohl das gesamte Protein Pex5p als auch das Verkürzungskonstrukt Pex5p/F1 (1-312 aa) interagieren mit Pex8p/KS4 (146-586 aa). Alle weiteren Verkürzungskonstrukte von Pex5p sind nicht mehr in der Lage mit Pex8p zu interagieren. Zur Interaktion mit Pex8p ist demnach der Bereich 1-312 aa notwendig. Die TPR-Domänen, welche für die Bindung des Rezeptors an das PTS1-Signal eines Cargoproteins notwendig sind (68, 69), sind für diese Interaktion entbehrlich.

3.6 Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex7p

Zur näheren Charakterisierung des von Pex8p notwendigen Bereiches zur Interaktion mit Pex7p, wurden die unter 3.3 beschriebenen Verkürzungskonstrukte von Pex8p auf ihre Interaktionsfähigkeit mit Pex7p getestet. Der Two-Hybrid-Stamm PJ69-4a wurde mit den geeigneten Plasmiden transformiert und nachfolgend die Reporteragenaktivität durch Wachstumstests der Transformanten auf geeignetem SD-Medium bestimmt. In Abbildung 3.6 ist diese Interaktionsstudie dargestellt.

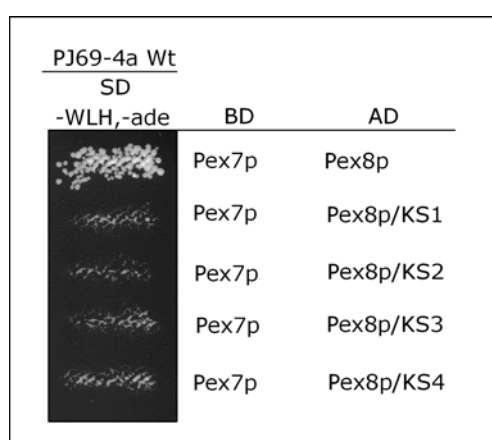


Abb. 3.6 Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex7p

Die Interaktionen zwischen Pex8p/KS1 (19-293 aa), Pex8p/KS2 (293-586 aa), Pex8p/KS3 (19-440 aa), Pex8p/KS4 (146-586 aa) und Pex7p wurden untersucht. Transformanten des Stammes PJ69-4a wurden auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reporteragenaktivität getestet. Pex8p interagiert mit Pex7p. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Zur Interaktion mit Pex7p wird das gesamte Pex8-Protein benötigt. Keines der Verkürzungskonstrukte von Pex8p interagiert noch mit dem PTS2-Rezeptor. Zur Untersuchung des putativen PTS2-Signals wurden zusätzlich zwei weitere Verkürzungskonstrukte von Pex8p hergestellt. Pex8p-(1-120 aa) enthielt das putative PTS2-Signal (siehe Abb. 3.3), während es in Pex8p-(1-102 aa) fehlte. Auch diese Verkürzungskonstrukte von Pex8p interagierten nicht mehr mit Pex7p (Daten nicht gezeigt).

3.7 Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex14p

Um den von Pex8p notwendigen Bereich zur Interaktion mit Pex14p näher zu charakterisieren, wurden die unter 3.3 beschriebenen Verkürzungskonstrukte von Pex8p auf ihre Interaktionsfähigkeit mit Pex14p getestet. Der Two-Hybrid-Stamm PJ69-4a wurde mit den geeigneten Plasmiden transformiert und nachfolgend die Reporterogenaktivität durch Wachstumstests der Transformanten auf geeignetem SD-Medium bestimmt. In Abbildung 3.7 ist diese Interaktionsstudie dargestellt.

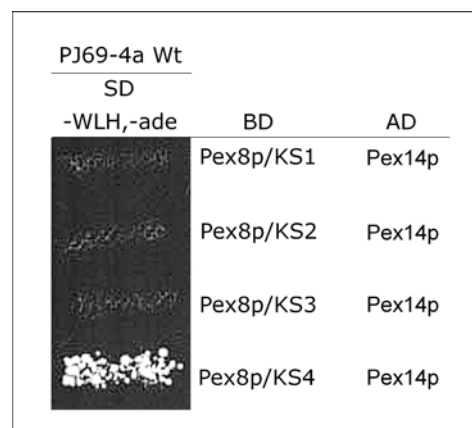


Abb. 3.7 Identifizierung des Bindebereiches von Pex8p zu Pex14p

Die Interaktionen zwischen Pex8p/KS1 (19-293 aa), Pex8p/KS2 (293-586 aa), Pex8p/KS3 (19-440 aa), Pex8p/KS4 (146-586 aa) und Pex14p wurden untersucht. Transformanten des Stammes PJ69-4a wurden auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reporterogenaktivität getestet. Pex8p und Pex8p/KS4 interagieren mit Pex14p. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Genauso wie Pex5p interagiert Pex14p nur mit Pex8p und dem Verkürzungskonstrukt Pex8p/KS4 (146-586 aa).

3.8 Sind die Interaktionen zwischen Pex8p und Pex5p, Pex7p und Pex14p direkt oder indirekt?

Eine Two-Hybrid-Interaktion muss nicht notwendiger Weise eine direkte Interaktion widerspiegeln. So ist es im homologen Testsystem möglich, dass zwei zu untersuchende Proteine X und Y aufgrund der Vermittlung eines sogenannten Brückenproteins miteinander interagieren. Das Zusammenspiel der Proteine X und Y mit diesem dritten Protein bleibt solange „unentdeckt“, wie es im Two-Hybrid-System enthalten ist und mit den zu untersuchenden

Interaktionspartnern in Wechselwirkung treten kann. Wird es aus dem System depletiert, können auch die Proteine X und Y nicht mehr miteinander interagieren.

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Interaktionen von Pex8p/KS4 (146–586 aa) mit Pex5p und Pex14p, sowie Pex8p mit Pex7p direkt sind oder durch ein weiteres Peroxin vermittelt werden, wurden die jeweiligen Peroxine auf ihre Interaktionsfähigkeit in verschiedenen Deletionsmutanten des Two-Hybrid-Stammes HF7c getestet. Die Deletionsmutanten dieses Stammes wurden dazu mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und nachfolgend die Reporterogenaktivität durch Wachstumstests der Transformanten auf geeignetem SD-Medium bestimmt. In Abbildung 3.8 ist diese Interaktionsstudie dargestellt. Tabelle 3.2 fasst die aus Abbildung 3.8 erhaltenen Daten zusammen.

Tab. 3.2 Zusammenfassung der Interaktionsstudie aus Abbildung 3.8

				Cargo-Rezeptor Bindung			Docking Maschinerie			Rezeptor Translokation	
BD	AD	Wt	<i>pex8</i> Δ	<i>pex5</i> Δ	<i>pex7</i> Δ	<i>pex21</i> Δ	<i>pex13</i> Δ	<i>pex14</i> Δ	<i>pex17</i> Δ	<i>pex10</i> Δ	<i>pex12</i> Δ
Pex8p-KS4	Pex5p	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+
Pex8p-KS4	Pex14p	+	(+)	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-
Pex7p	Pex8p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

		Rezeptor-Recycling				PMP Lokalisation
BD	AD	<i>pex1</i> Δ	<i>pex6</i> Δ	<i>pex15</i> Δ	<i>pex22</i> Δ	<i>pex19</i> Δ
Pex8p-KS4	Pex5p	+	+	+	+	+
Pex8p-KS4	Pex14p	+	+	(+)	(+)	+
Pex7p	Pex8p	+	+	+	+	+

Die Two-Hybrid-Untersuchungen erfolgten im Stamm HF7c. Für die Stammbezeichnungen innerhalb der Tabelle gilt: *pex1*Δ = HF7c *pex1*Δ, etc. + Wachstum, (+) schwaches Wachstum, (-) kein Wachstum.

Keine der Kontrollen (Pex8p-KS4 (146-586 aa), Pex7p, Pex5p, Pex14p, Pex8p) zeigte eine Autoaktivierung des Reportergens.

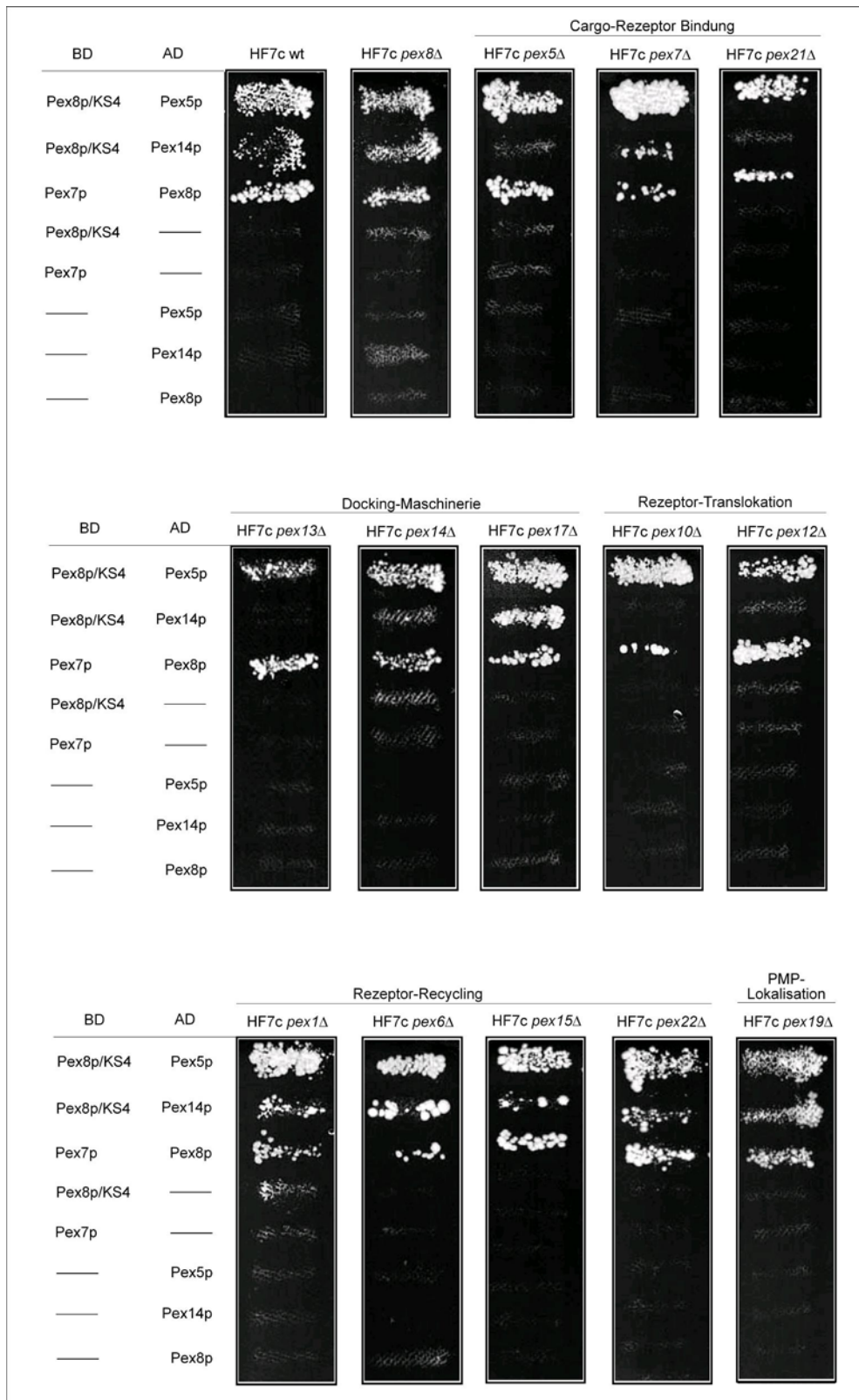


Abb. 3.8 Two-Hybrid-Untersuchungen in verschiedenen Mutanten des Two-Hybrid-Stammes HF7c

Two-Hybrid-Interaktionen zwischen Pex8p/KS4 (146-586 aa), Pex5p und Pex14p, zwischen Pex8p und Pex7p in den jeweiligen Deletionsmutanten im Wildtyp des Stammes HF7c. Die Deletionsmutanten werden mit den aufgeführten Plasmiden transformiert, auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reportergenaktivität untersucht. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, -: Vektor ohne Fremd-DNA, SD: Minimalmedium

Die Interaktion zwischen Pex8p-KS4 (146-586 aa) und Pex5p kann in allen untersuchten Mutanten nachgewiesen werden. In HF7c *pex13*Δ ist das Wachstum der Transformante geschwächt, so dass nicht auszuschließen ist, dass Pex13p diese Interaktion beeinflusst. Genauso findet die Interaktion zwischen Pex8p und Pex7p in allen untersuchten Mutanten statt. Bei beiden Interaktionen ist daher davon auszugehen, dass sie nicht durch die hier untersuchten peroxisomalen Proteine vermittelt werden. Die Interaktion zwischen Pex8p-KS4 (146-586 aa) und Pex14p in den verschiedenen Mutanten ist nicht einheitlich zu beschreiben. Sie findet weiterhin in Transformanten der Deletionsmutanten HF7c *pex1*Δ und HF7c *pex6*Δ (Funktionskreis des Rezeptor-Recycling) und der Mutante HF7c *pex19*Δ (Lokalisation von PMP) statt. Stark abgeschwächt ist diese Interaktion ebenfalls in den Mutanten HF7c *pex8*Δ, HF7c *pex7*Δ (Cargo-Rezeptor-Bindung), HF7c *pex17*Δ (Docking-Maschinerie), HF7c *pex15*Δ und HF7c *pex22*Δ (Rezeptor-Recycling) zu detektieren. Die Peroxine Pex5p und Pex21p (Cargo-Rezeptor-Bindung), Pex13p und Pex14p (Docking-Maschinerie), Pex10p und Pex12p (Rezeptor-Translokation) scheinen daher die Interaktion zwischen Pex8p-KS4 (146-586 aa) und Pex14p direkt zu vermitteln oder derart zu beeinflussen, dass ein Fehlen einer dieser Komponenten zum Interaktionsverlust führt. Die Peroxine Pex8p, Pex7p (Cargo-Rezeptor-Bindung), Pex17p (Docking-Maschinerie), Pex15p und Pex22p (Rezeptor-Recycling) scheinen demzufolge die Interaktion ebenfalls zu unterstützen, da ihr Fehlen eine Abschwächung der Interaktion zur Folge hat.

3.9 Pex8p interagiert mit sich selbst

Mit Pex14p existiert ein peroxisomales Membranprotein, das in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren. Ob dies auch auf Pex8p zutrifft und eventuell ein Interaktionsbereich von Pex8p zu den unter 3.3 beschriebenen Verkürzungsstrukturen von Pex8p eingrenzbar ist, wurde nachfolgend untersucht.

Pex8p ist in der Lage mit Pex8p (19-589 aa) und Pex8p/KS4 (146-586 aa) zu interagieren.

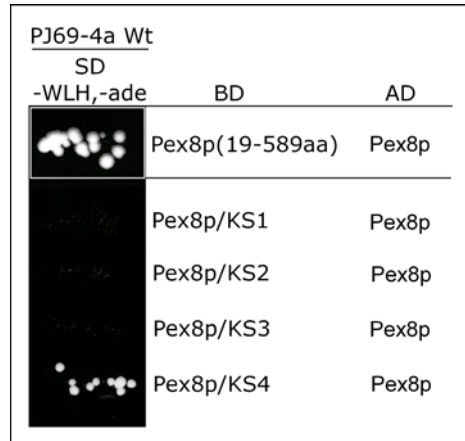


Abb. 3.9 Interaktion von Pex8p mit Pex8p

Transformanten des Stammes PJ69-4a wurden auf Selektivmedien aufgetragen und auf Reporterogenaktivität untersucht. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden:

Pex8p bindet beide PTS-Rezeptoren und interagiert sowohl mit dem membranständigen peripheren Peroxin Pex14p als auch mit sich selbst. Es interagiert nicht mit Pex13p, mit Verkürzungen von Pex13p, mit Pex17p oder mit dem PTS2-haltigen Protein Fox3p.

Während Pex7p nur mit dem gesamten Pex8-Protein interagieren kann, interagieren Pex5p, Pex8p und Pex14p sowohl mit Pex8p als auch mit dem Verkürzungs-konstrukt Pex8p/KS4 (146-586 aa).

Zur Interaktion zwischen Pex8p und Pex5p benötigt Pex5p nicht die TPR-Domänen, sondern interagiert mit dem Bereich Pex5p(1-312 aa) mit Pex8p.

Die Interaktionen zwischen Pex8p und den Rezeptoren Pex5p und Pex7p werden durch keines der untersuchten Peroxine vermittelt und scheinen direkt zu sein.

Die Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p wird von Peroxinen verschiedener Funktionskreise beeinflusst.

3.10 Identifikation des Bindebereiches von Pex8p zu Pex5p durch Two-Hybrid-Analyse

3.10.1 Ungerichtete Mutagenese von Pex8p durch fehleranfällige PCR

ScPex8p interagiert mit Pex5p (171) und Pex7p (3.2), den Rezeptorproteinen für PTS1- und PTS2-Proteine. Welche Relevanz diese Interaktion für den Importmechanismus von PTS1- und PTS2-Proteinen in das Peroxisom besitzt, ist nicht geklärt. Die „Extended Shuttle“-Hypothese besagt, dass die Rezeptoren in das Lumen der Peroxisomen importiert werden, dort ihre Cargoproteine entlassen und in einem anschließenden Recycling-Prozess zurück in das Cytosol der Zelle gelangen. Pex8p könnte hier die Rolle des intraperoxisomalen Dockingproteins für die Cargo-beladenen Rezeptoren Pex5p und Pex7p übernehmen oder für die Trennung des Cargos vom Rezeptor notwendig sein. Um die Interaktion von Pex8p zu Pex5p näher zu charakterisieren, wurde zunächst der Bindebereich von Pex8p zu Pex5p näher eingegrenzt (3.4). Nachfolgende Mutagenese von Pex8p sollte einzelne Aminosäureveränderungen bewirken und den oder die Interaktionsbereiche von Pex8p für Pex5p näher definieren, um Aussagen über dafür notwendige Aminosäuren oder Bindemotive treffen zu können. Zu diesem Zweck erfolgte eine ungerichtete Mutagenese von *PEX8*. Zur Amplifikation der DNA-Sequenz von *PEX8* wurde die taq-Polymerase (ABgene, Epsom, U.K.) verwendet. Die Taq-Polymerase besitzt keine sogenannte „proofreading“-Aktivität (3'-5'-Exonuclease-Aktivität) und ist daher nicht in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide aus dem neu synthetisierten DNA-Strang zu entfernen. Dadurch amplifiziert sie DNA-Sequenzen mit einer enzymespezifischen Fehlerrate. Desweiteren lässt sich die Fehlerrate der Polymerase unter anderem weiter durch die Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen des Reaktionspuffers und Veränderungen im Gleichgewicht der Nukleotide erhöhen (42, 65, 249). Zur Erstellung einer *PEX8*-DNA-Bibliothek mit zufallsgenerierten Mutationen wurden alle drei Ansätze verfolgt. Die verwendete DNA-Matrize von *PEX8* umfasste nicht die gesamte, für das Protein Pex8p codierende Sequenz, sondern den Bereich von 57-1758 bp (19-586 aa). Die ersten 56 Basenpaare wurden nicht verwendet, da aus früheren Studien bekannt war, dass das gesamte Pex8-Protein, fusioniert mit der Gal4p-BD (pPC97), im Hefe-Two-Hybrid-Assay eine Autoaktivierung der Reportergene hervorruft (169). Desweiteren fehlte die für das Peptid SKL codierende Sequenz, da das PTS1-

Signal von Pex8p für die Interaktion mit Pex5p nicht notwendig ist. Die PCR-Produkte wurden zunächst in den Vektor pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad (USA)), nachfolgend in den Two-Hybrid-Vektor pPC97 unter Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen einkloniert. Diese *PEX8*-DNA-Bibliothek mit zufallsgenerierten Mutationen wird im weiteren Kontext als pPC97-*pex8M* (57bp-1758bp), die Proteine als Pex8pM (19-586aa) bezeichnet. Es erfolgte eine Kotransformation von pPC86-*PEX5* und pPC97-*pex8M* in den Hefe Two-Hybrid-Stamm PJ69-4a und anschließend eine Selektion auf SD_{-WL}-Agarplatten. Diese Platten wurden als Masterplatten bezeichnet, anhand derer der Transformationserfolg beurteilt wurde. Die anschließende Selektion der Transformanten auf geeigneten SD_{-WLH}-Agarplatten ermöglichte eine Identifizierung der Hefekolonien, die keine Reporterogenaktivität mehr aufwiesen. Im Vergleich zu den Masterplatten wuchsen diese Hefekolonien nicht mehr und wurden den Masterplatten entnommen. Insgesamt interagierten 60% der Transformanten nicht mehr miteinander. Durch Anzucht dieser Zellen in Vollmedium verloren sie unter mangelndem Selektionsdruck willkürlich eines oder beide Plasmide. Ein Teil dieser Flüssigkultur wurde auf Vollmedium-Agarplatten ausplattiert und nach 2-3 Tagen auf SD_{-W} - und SD_{-L} - Agarplatten überstempelt. Es wurden die Zellen selektiert, die nur noch das pPC97-*pex8M*-Plasmid trugen. Nach Isolierung der Plasmide aus den Hefezellen wurde die Plasmid-DNA mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert und nachfolgend sequenziert. Die im Zusammenhang mit dem Two-Hybrid-Screen ausgeführten Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit L. Hodzic (91).

Drei aus dieser Arbeit isolierten Mutationen wurden unter Verwendung der gerichteten Mutagenese (Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit[®], Stratagene, (USA)) vereinzelt in *PEX8* eingeführt, genannt *pex8M-A*, *pex8M-C* und *pex8M-D*. Die Proteine Pex8pM-A, Pex8pM-C, Pex8pM-D wurden durch verschiedene Funktionsanalysen wie Two-Hybrid-Analyse (3.10.4), Wachstums- und Komplementationstest (3.10.5) auf Ölsäuremedium sowie Fluoreszenzmikroskopie (3.10.6) charakterisiert.

In der Abbildung 3.10 sind die einzelnen Schritte dieser Analyse verkürzt dargestellt.

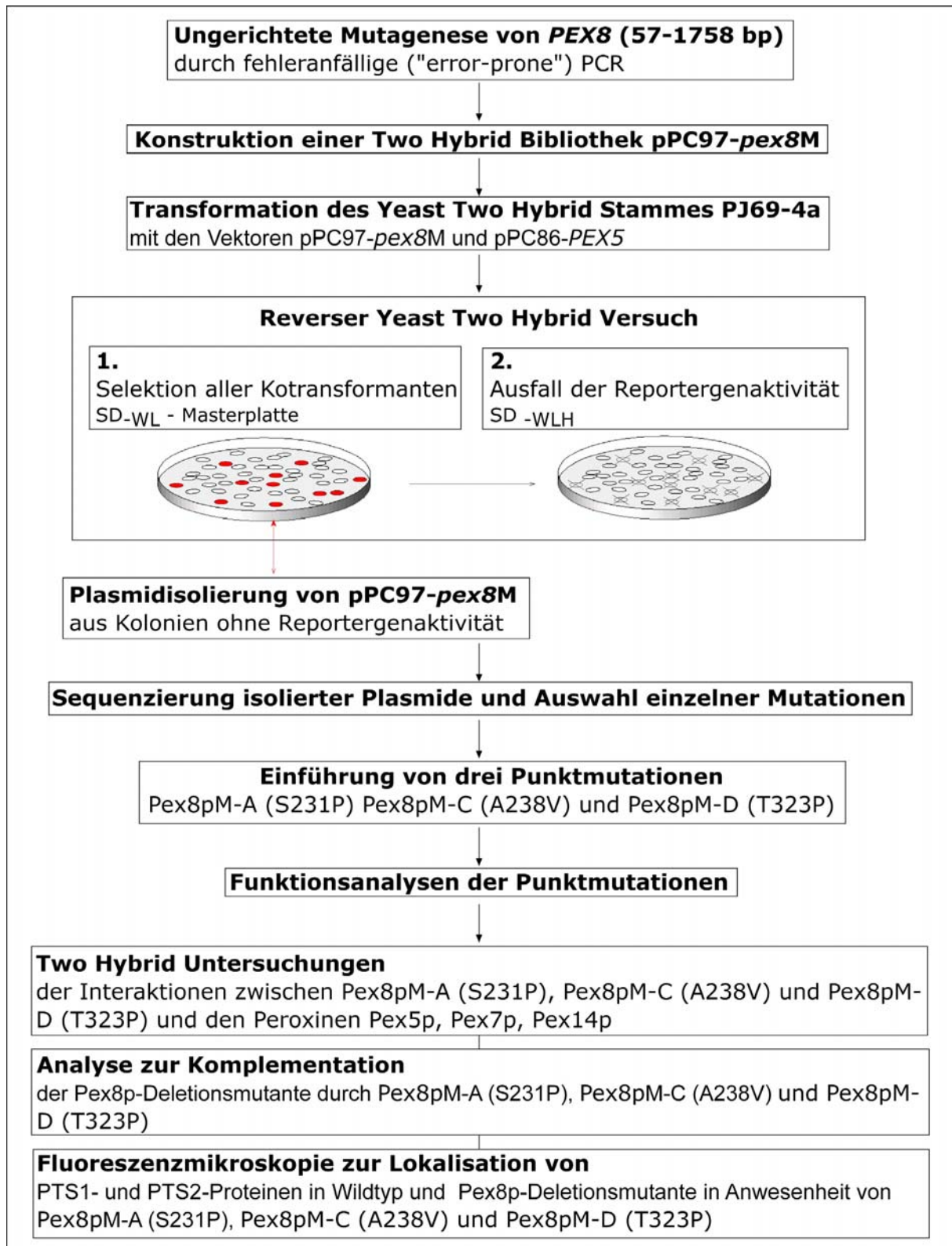


Abb. 3.10 Fließschema der Arbeitsabläufe zur ungerichteten Mutagenese und nachfolgender Analysen

Ungerichtete Mutagenese von *PEX8*, anschließender Two-Hybrid-Screen, gerichtete Mutagenese und Funktionsanalyse der Proteine Pex8pM-A, Pex8pM-C, Pex8pM-D

Um zu überprüfen, ob diese mutierten Pex8-Proteine tatsächlich für den Ausfall der Interaktion zu Pex5p verantwortlich waren, wurden die aus der Plasmidisolierung gewonnenen pPC97-*pex8M*-Plasmide erneut mit pPC86-*PEX5* in den Stamm PJ69-4a kotransformiert. In Abbildung 3.11 ist das Ergebnis dieser Two-Hybrid-Untersuchung dargestellt.


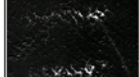


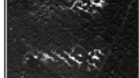
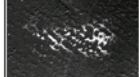
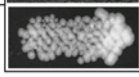

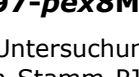
BD	AD	PJ69-4a Wt
		SD -WLH,-ade
Pex8p(19-586aa)M-4	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-5	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-9	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-13	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-19	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-20	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-39	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)M-51	Pex5p	
Pex8p(19-586aa)Wt	Pex5p	

Abb. 3.11 Hefe Two-Hybrid-Analyse isolierter pPC97-*pex8M*-Plasmide

Aus der unter Kapitel 3.10.1 beschriebenen Two-Hybrid-Untersuchung isolierte pPC97-*pex8M*-Plasmide werden erneut mit dem Vektor pPC86-*PEX5* in den Stamm PJ69-4a kotransformiert und die Fusionsproteine auf Interaktion zueinander getestet. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Keines der mutierten Pex8-Proteine war noch in der Lage mit Pex5p zu interagieren. Daher konnten diese pPC97-*pex8M*-Plasmide zur weiteren Analyse verwendet werden.

3.10.2 Sequenzanalyse der Pex8pM-Proteine, die nicht mehr mit dem Rezeptorprotein Pex5p interagieren

Die unter Kapitel 3.10.1 beschriebene Mutationsbibliothek von *PEX8*, pPC97-*pex8M* wurde mit pPC86-*PEX5* kotransformiert. Aus den Kolonien ohne Reportergenaktivität wurde das jeweilige pPC97-*pex8M*-Plasmid isoliert und in *E. coli* transformiert. Die nach Transformation von *E. coli* gewonnene Plasmid-DNA

wurde sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzdaten von sieben pPC97-*pex8M*-Plasmiden sind in den Abbildungen 3.12, 3.13 und Tabelle 3.3 dargestellt.

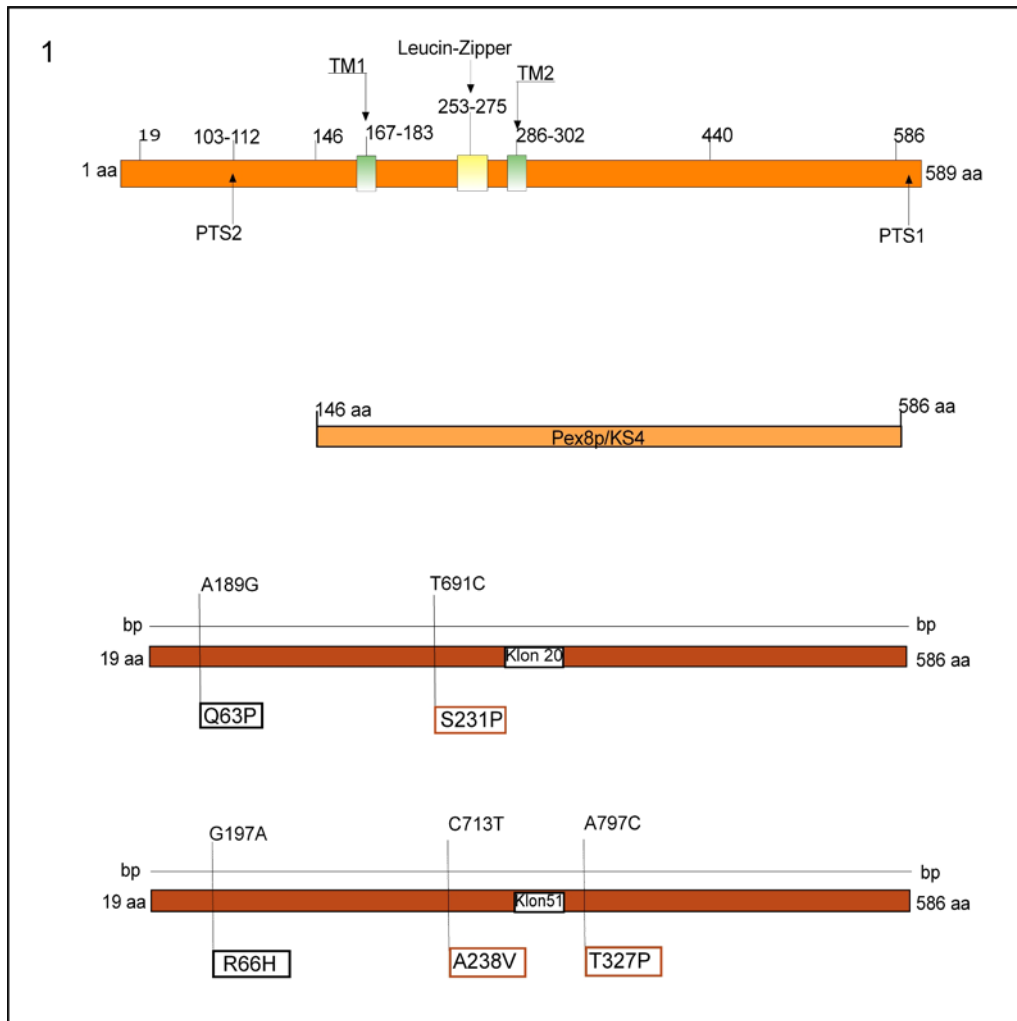


Abb. 3.12 Schematische Darstellung der Sequenzdaten nach Two-Hybrid-Screen erhaltener pPC97-*pex8M*-Plasmide

- 1) Darstellung der Klone pPC97-*pex8M*-20 und pPC97-*pex8M*-51. Die Mutationen dieser Klone wurden für die gerichtete Mutagenese einzeln in *PEX8* eingeführt.
 Auswahlkriterien für die erneute Einführung einer Mutation durch gerichtete Mutagenese:
 (a) die Mutationen lagen im Bereich Pex8p/KS4 (146-586 aa), der ausreichend für die Interaktion zwischen Pex8p und Pex5p ist.
 (b) auf der Ebene der Aminosäuren wurde eine Veränderung verursacht.
 (c) durch Austausch der Aminosäuren wurden die Ladungsverhältnisse verändert.
 (d) die relative Lage der Mutationen zu den Motivvorschlägen der unterschiedlichen *in silico*-Analysen von Pex8p.

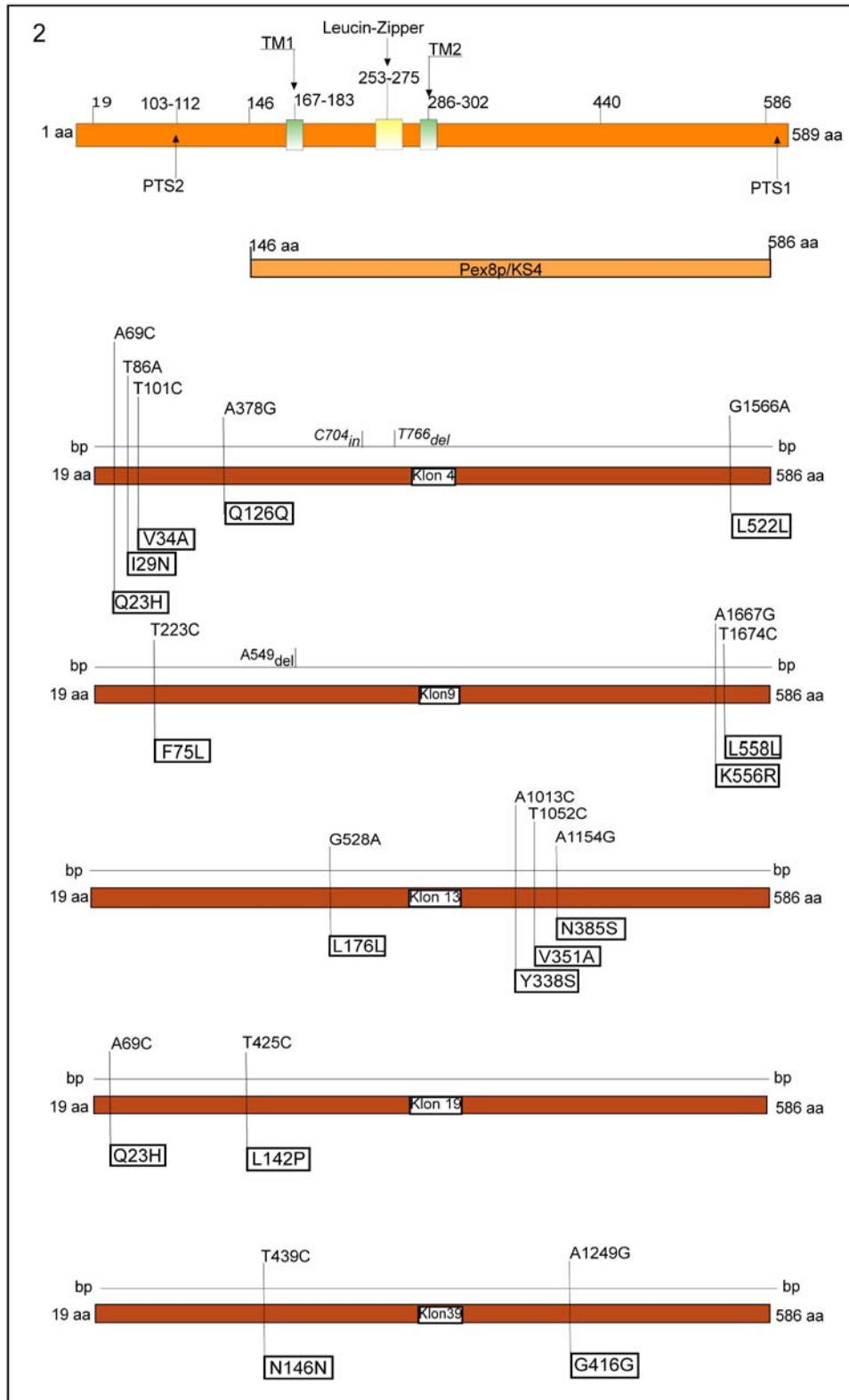


Abb. 3.13 Schematische Darstellung der Sequenzdaten nach Two-Hybrid-Screen erhaltener pPC97-*pex8M*-Plasmide

2) Darstellung der Klone pPC97-*pex8M*-4, pPC97-*pex8M*-9, pPC97-*pex8M*-13, pPC97-*pex8M*-19 und pPC97-*pex8M*-39. Die Mutationen dieser Klone wurden für die gerichtete Mutagenese nicht in Betracht gezogen. Auswahlkriterien siehe Abbildungsunterschrift Abb. 3.12.

Tab. 3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Sequenzdaten nach Two-Hybrid Screen erhaltener pPC97-*pex8M*-Plasmide

	DNA-Sequenz	Aminosäuresequenz
Klon 4	A 69 C T 86 A T 101 C A 378 G	Q 23 H I 29 N V 34 A Q 126 Q
Klon 5 = Klon 20	A 189 G T 691 C	Q 63 P S 231 P
Klon 9	T 223 C A 1667 G T 1674 C	F 75 L K 556 R L 558 L
Klon13	G 528 A A 1013 C T 1052 C A 1154 G	L 176 L Y 338 S V 351 A N 385 S
Klon 19	A 69 C T 425 C	Q 23 H L 142 P
Klon 39	T 439 C A 1249 G	N 146 N G 416 G
Klon51	G 197 A C 713 T A 979 C	R 66 H A 238 V T 327 P

Rot markiert sind die Mutationen, welche erneut durch gerichtete Mutagenese in *PEX8* eingeführt wurden.

Alle sieben bzw. acht pPC97-*pex8M*-Plasmide wiesen multiple Veränderungen der DNA-Sequenz auf. Daher wurden vier Kriterien für die Auswahl der Mutationen durch gerichtete Mutagenese berücksichtigt:

- Die Mutationen lagen im Bereich Pex8p/KS4 (146-586 aa), der ausreichend für die Interaktion zwischen Pex8p und Pex5p ist.
- Auf der Ebene der Aminosäuren wurde eine Veränderung verursacht.
- Durch Austausch der Aminosäuren wurden die Ladungsverhältnisse verändert.
- Die Mutationen befanden sich in der Nähe zu den Motivvorschlägen der unterschiedlichen *in silico*-Analysen von Pex8p.

Aus diesen Gründen wurden die Plasmide pPC97-*pex8M*-4, pPC97-*pex8M*-9, pPC97-*pex8M*-13, pPC97-*pex8M*-19 und pPC97-*pex8M*-39 nicht für die nachfolgende gerichtete Mutagenese in Betracht gezogen. Zur Vereinzelung der

Mutationen wurden die Sequenzdaten der Plasmide pPC97-*pex8M*-51 und pPC97-*pex8M*-20 herangezogen.

3.10.3 Einführung und Analyse von Einzelmutationen in *PEX8*

Aus den unter Tabelle 3.3 beschriebenen Sequenzdaten wurden drei Mutationen nach genannten Auswahlkriterien einzeln durch gerichtete Mutagenese in *PEX8* eingeführt. In Abbildung 3.14 sind die vereinzelt Mutationen dargestellt.

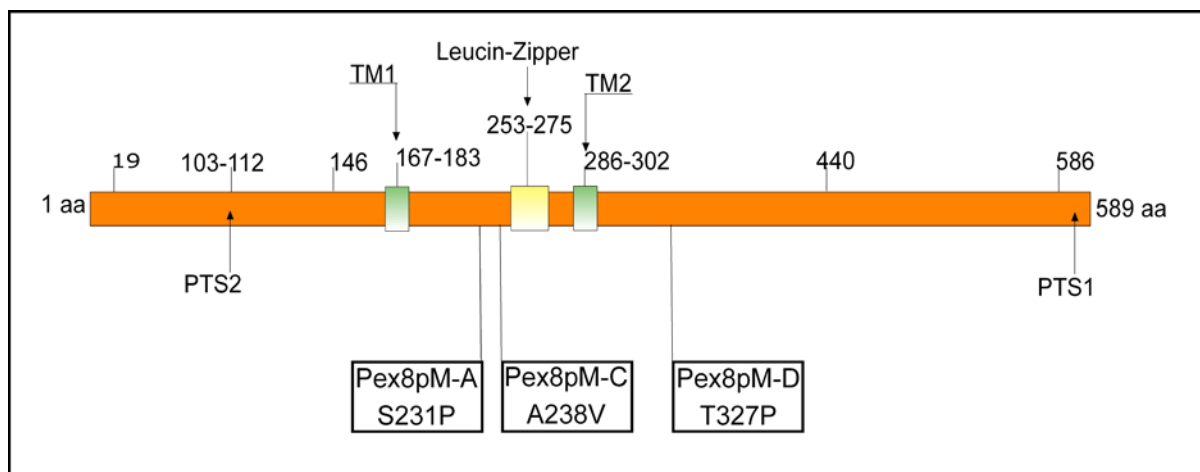


Abb. 3.14 Darstellung der einzeln in Pex8p eingeführten Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P)

Die Mutationen T691C (S231P), C713T (A238V) und A979C (T327P) wurden einzeln mit Hilfe der gerichteten Mutagenese in *PEX8* eingeführt. Für Two-Hybrid-Analysen, Wachstumstests und Fluoreszenzmikroskopie erfolgte deren Klonierung in die entsprechenden Vektoren.

3.10.4 Two-Hybrid-Analyse der Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P)

Die jeweils codierenden Sequenzen der Mutationen *pex8M*-A, *pex8M*-C, *pex8M*-D wurden in die Two-Hybrid-Vektoren pPC97 und pPC86 einkloniert. Eine anschließende Two-Hybrid-Untersuchung sollte zeigen, ob diese Mutationen von Pex8p noch in der Lage waren mit Pex5p zu interagieren. Da Pex8p ebenfalls mit den Peroxinen Pex7p und Pex14p interagiert, wurden diese mutierten Pex8-Proteine ebenfalls auf ihre Interaktionsfähigkeit mit Pex7p und Pex14p getestet. Bei der Klonierung der jeweiligen Pex8p-Konstrukte wurden jeweils Fragmentlängen von Pex8p erzeugt, die sowohl zur Interaktion mit dem jeweiligen Partner notwendig waren, als auch Bereiche von Pex8p ausgespart, die zur Autoaktivierung der Reportergene führten (169).

In Abbildung 3.15 sind die Interaktionsstudien von Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) mit den Peroxinen Pex5p, Pex7p und Pex14p zusammengefasst.

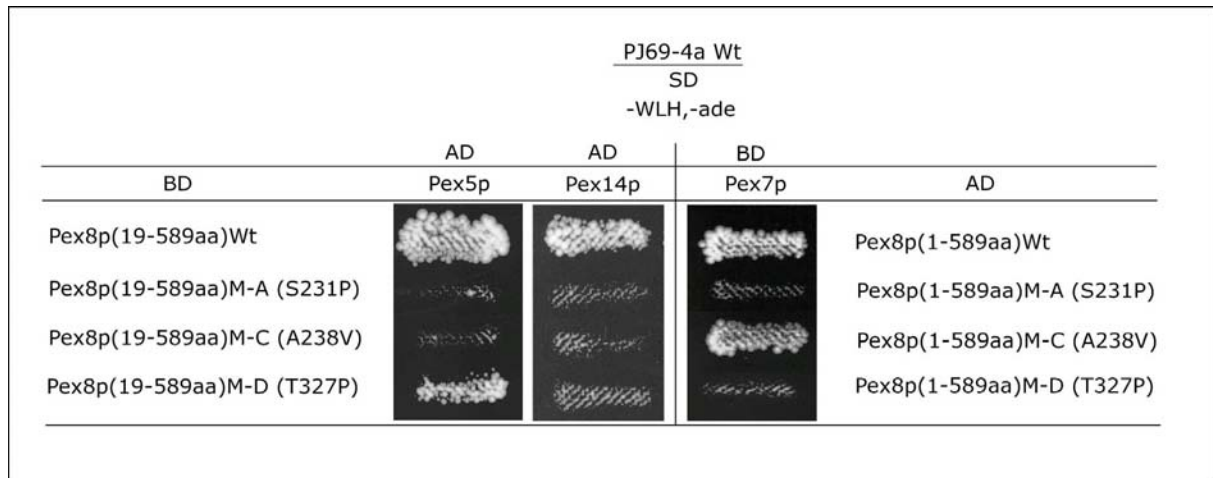


Abb. 3.15 Interaktionen zwischen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) und den Peroxinen Pex5p, Pex7p und Pex14p

Der Two-Hybrid-Stamm PJ69-4a wurde mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und das Wachstum der Transformanten auf SD-Medium getestet. BD: DNA-Bindedomäne, AD: Transkriptionsaktivierende Domäne, SD: Minimalmedium

Die Mutationen Pex8pM-A (S231P) und Pex8pM-C (A238V) bewirken einen Ausfall der Protein-Protein-Interaktion zwischen Pex5p und Pex8p, während Pex5p mit Pex8pM-D (T327P) weiterhin interagieren kann.

Pex7p kann nicht mehr mit Pex8pM-A (S231P) und Pex8pM-D (T327P) interagieren, jedoch mit Pex8pM-C (A238V). Alle Protein-Protein-Interaktionen zwischen Pex14p und den drei mutierten Pex8p-Proteinen sind ausgefallen.

3.10.5 Komplementationsanalyse der Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) in UTL-7A *pex8* Δ

Um zu ermitteln, ob die jeweiligen Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) in der Lage sind den Wachstumsdefekt der Deletionsmutante UTL-7A *pex8* Δ zu komplementieren, wurden die jeweiligen für Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V) und Pex8pM-D (T327P) codierenden Sequenzen in einen Vektor mit ölsäureinduzierbarem *FOX3*-Promotor (2.5.1) kloniert. Sowohl UTL-7A als auch UTL-7A *pex8* Δ wurden mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und auf Oleatplatten in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetüpfelt. In Abbildung 3.16 ist der Wachstumstest dargestellt.

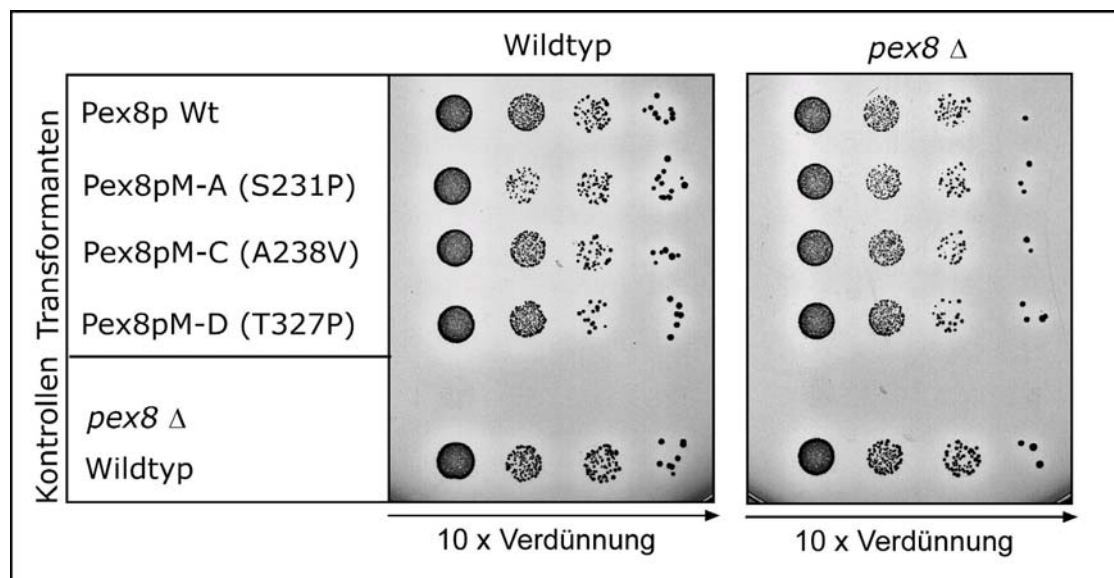


Abb. 3.16 Funktionelle Komplementation von UTL-7A *pex8* Δ durch Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P)

Komplementationsanalyse von UTL-7A *pex8* Δ durch Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) im Vergleich zu UTL-7A und UTL-7A *pex8* Δ , Wachstumsverhalten der genannten Transformanten auf ölsäurehaltigem Agar bei 30°C, Inkubation 7 Tage, Aufgetragen jeweils 10fach-Verdünnungen.

Alle mutierten Proteine Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) sind in der Lage den Wachstumsdefekt der Pex8p-Deletionsmutante zu komplementieren. Obwohl Pex8pM-A (S231P) im Hefe Two-Hybrid-System einen Komplettausfall zu allen getesteten Peroxinen Pex5p, Pex7p und Pex14p aufweist, kann der Hefestamm UTL-7A *pex8* Δ [Pex8pM-A (S231P)] auf Ölsäureplatten wachsen. Gleiches gilt für die beiden anderen mutierten Proteine. Daraus lässt sich folgern, dass die beobachteten Interaktionen von Pex8p zu den

Peroxisinen Pex5p, Pex7p und Pex14p nicht direkt mit dem Import von PTS1- und PTS2-Proteinen zusammenhängen.

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)

Um die unter Kapitel 3.10.5 beschriebenen Ergebnisse fluoreszenzmikroskopisch zu validieren, wurden sowohl UTL-7A und UTL-7A *pex8Δ* gleichzeitig mit drei verschiedenen Vektoren transformiert. Der erste Vektor (2.5.1) codiert für ein Fusionsprotein aus dem PTS2-Signal und dem rot fluoreszierenden Reporterprotein DsRed. Er wurde vor der Transformation der Hefezellen linearisiert, so dass durch homologe Rekombination die Integration des Vektors in das Genom von *S. cerevisiae* erfolgte. Der zweite Vektor (2.5.1) codiert für ein Fusionsprotein aus dem PTS1-Signal und dem grün fluoreszierendem Reporterprotein GFP. Der dritte Vektor (3.10.5) besteht aus der jeweiligen für Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V) und Pex8pM-D (T327P) codierenden Sequenz.

In Abbildung 3.17 ist die Lokalisationsanalyse dieser PTS1- und PTS2-Fusionsproteine in Anwesenheit der jeweiligen Pex8p-Mutationen dargestellt.

Die PTS1- und PTS2-Fusionsproteine in Abbildung 3.17 zeigen in allen Zellen ein deckungsgleiches punktiertes Muster. Es gibt zu den transformierten Wildtypzellen und den transformierten *pex8Δ*-Zellen keinen Unterschied im Vergleich zum Verteilungsmuster der Proteine PTS2-dsRed und PTS1-GFP.

Dies deckt sich mit der unter Kapitel 3.10.5 beschriebenen Wachstums- und Komplementationsanalyse der Pex8p-Deletionsmutante mit den jeweiligen Mutationen von Pex8p, bei der alle Transformanten in der Lage waren auf Oleatmedium zu wachsen.

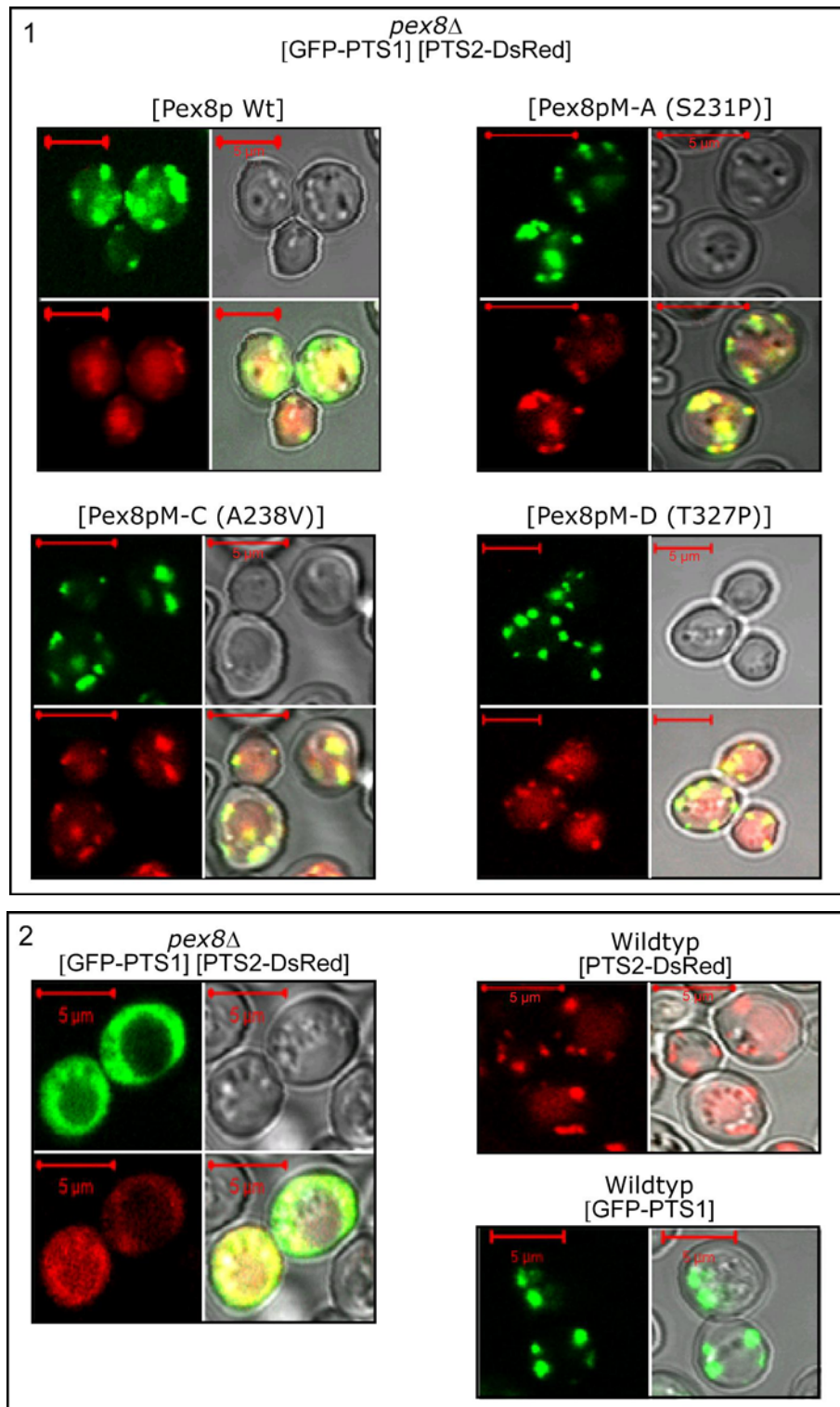


Abb. 3.17 Lokalisationsanalyse von GFP-PTS1 und PTS2-DsRed in UTL-7A *pex8Δ* [Pex8pM-A (S231P)], UTL-7A *pex8Δ* [Pex8pM-C (A238V)] und UTL-7A *pex8Δ* [Pex8pM-D (T327P)]

1) *pex8Δ* [GFP-PTS1][PTS2-DsRed] wurde mit den für Pex8p Wt, Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V) und Pex8pM-D (T327P) codierenden Plasmiden transformiert und die Lokalisation beider Fluoreszenzproteine mikroskopisch untersucht.

2) Lokalisation der Fluoreszenzproteine in *pex8Δ* und Wildtyp.

Die Transformanten wurden 3-5 Tage auf Oleatplatten inkubiert. Zur Mikroskopie wurde von den Oleatplatten entnommenes Zellmaterial verwendet.

3.11 Wie gelangt Pex8p an die peroxisomale Membran?

In der Primärsequenz von Pex8p ist am extremen C-Terminus ein PTS1-Signal und im N-terminalen Bereich ein mögliches PTS2-Signal zu identifizieren (171). Dies legt die Vermutung nahe, dass Pex8p durch einen der beiden Rezeptoren oder durch deren Zusammenwirken zur peroxisomalen Membran gelangt. Rehling *et al.* beschrieben, dass UTL-7A *pex8Δ* Zellen durch ein Pex8-Protein ohne SKL komplementiert werden können (171). Dies scheint eine Rolle des PTS1-Rezeptors beim Targeting von Pex8p zur peroxisomalen Membran zumindest über dessen PTS1-Signal auszuschließen. Es weist aber gleichzeitig auf eine zweite Bindungsstelle von Pex5p zu Pex8p hin, da auch zur Interaktion der beiden Peroxine im Two-Hybrid-System ebenfalls das PTS1-Signal von Pex8p nicht notwendig ist, und die TPR-Domänen von Pex5p ebenfalls entbehrlich sind (3.5). Ungeklärt ist ebenfalls, ob Pex7p für das Targeting von Pex8p zur peroxisomalen Membran benötigt wird. Daher sollte in nachfolgenden Analysen das Targeting von Pex8p-ProtA in Abhängigkeit der beiden Rezeptoren untersucht werden.

3.11.1 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Pex8p-ProtA in den Mutanten UTL-7A *pex5Δ*, UTL-7A *pex7Δ*, UTL-7A *pex5Δ pex7Δ* wurde ein zellfreies Lysat der Zellen auf einen kontinuierlichen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und durch isopyknische Zentrifugation getrennt. Dadurch wurde eine Trennung der einzelnen Organellentypen, insbesondere der Peroxisomen und Mitochondrien, sowie die Trennung der löslichen Bestandteile voneinander möglich. Ölsäure-induzierte Peroxisomen sind im Bereich der Dichten 1,21-1,23 g/cm³ zu finden, während Mitochondrien im Dichtebereich 1,17-1,18 g/cm³ detektierbar sind. Die biochemischen Analysen dieser Dichtegradienten sind in den Abbildungen 3.18 bis 3.21 dargestellt.

Die Peakfraktion des peroxisomalen Leitenzyms Katalase konnte im UTL-7A[Pex8p-ProtA] in der Fraktion 11 bei einer Dichte von 1,23 g/cm³ detektiert werden. Die Fumarase hatte in Fraktion 15 bei einer Dichte von 1,18 g/cm³ ihr Maximum. Damit waren beide Enzyme im erwarteten Dichtebereich zu finden. Fox3p und das peroxisomale Membranprotein Pex13p hatten in den Fraktionen 11 und 13 ihr Maximum. Beide Proteine konnten auch in Fraktionen geringerer

Dichte detektiert werden. Pex8p-ProtA war nur schwach zu detektieren, befand sich aber ebenfalls in den Fraktionen 11 und 13, sowie in der Fraktion 27. Die Verteilung der Leitenzyme des Stammes UTL-7A[Pex8p-ProtA] entsprach einer typischen Verteilung. Damit konnte UTL-7A[Pex8p-ProtA] als Positivkontrolle gelten. Da alle analysierten Zellen wie UTL-7A[Pex8p-ProtA] behandelt wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl die Verteilung ihrer Leitenzyme Katalase und Fumarase als auch die Verteilung der immunologisch nachgewiesenen Proteine Fox3p, Pex8p-ProtA und des Membranmarkers Pex13p einer *in vivo*-ähnlichen Verteilung entsprach.

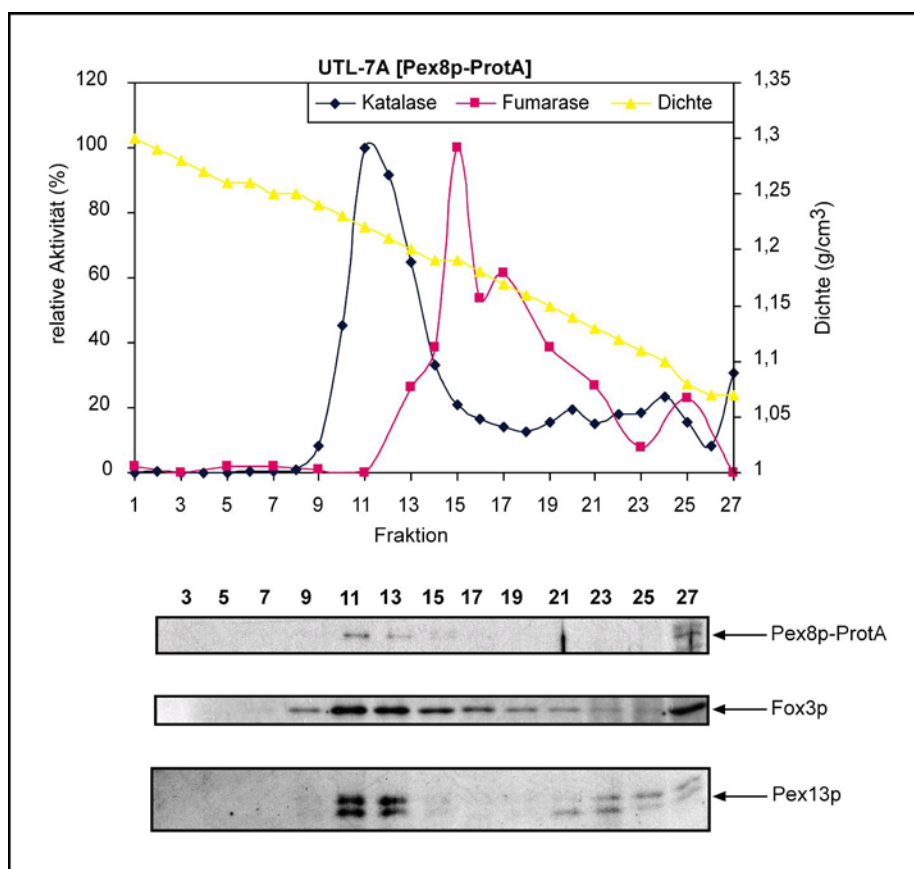


Abb. 3.18 Subzelluläre Fraktionierung des zellfreien Lysates von UTL-7A[Pex8p-ProtA] mittels eines kontinuierlichen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

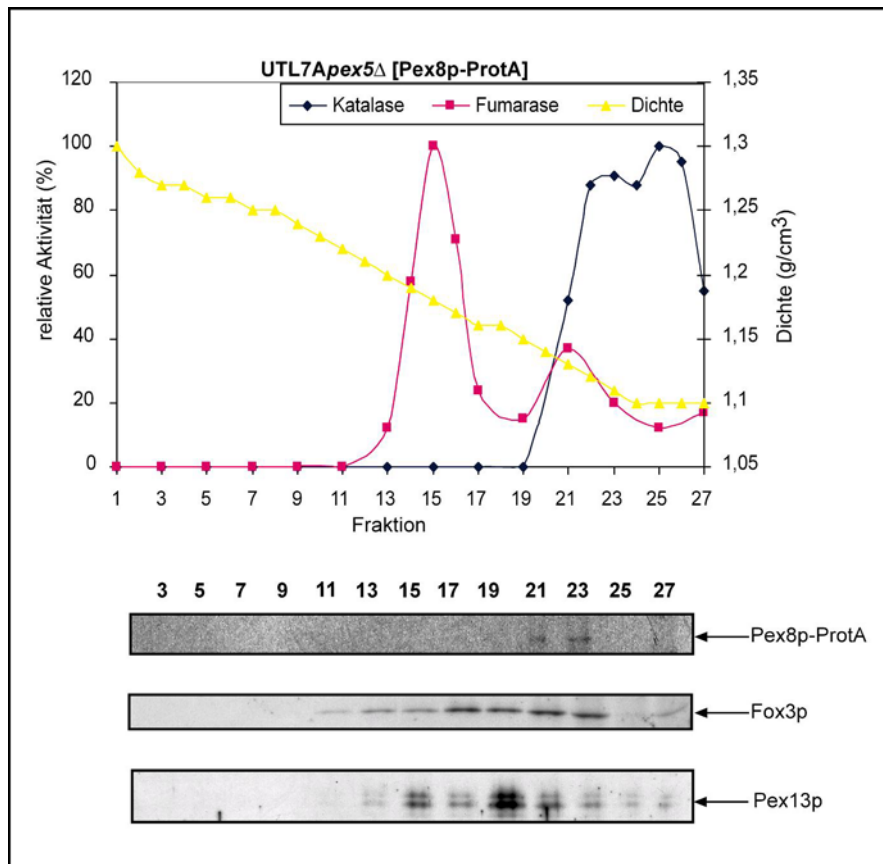


Abb. 3.19 Subzelluläre Fraktionierung des zellfreien Lysates von UTL-7A *pex5*Δ[Pex8p-ProtA] mittels eines kontinuierlichen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

In UTL-7A *pex5*Δ[Pex8p-ProtA] befand sich die Katalase in den Fraktionen 21-27 und hatte ihr Maximum in der Fraktion 25 bei einer Dichte von 1,07 g/cm³. Die Verteilung der Fumarase war von dieser Verschiebung in den Bereich niedrigerer Dichte im Vergleich zum Wildtypen nicht beeinflusst. Obwohl der Import des Fox3-Proteins in Peroxisomen vom Fehlen des PTS1-Rezeptors nicht betroffen ist, befand sich die Thiolase (Fox3p) im Vergleich zum Wildtypen in Fraktionen geringerer Dichte, besonders in den Fraktionen 17-23. Damit einher ging eine Verschiebung des peroxisomalen Membranmarkerproteins Pex13p in denselben Bereich mit einem Maximum bei Fraktion 19. Diese Verschiebung könnte mit der Tatsache einhergehen, dass alle PTS1-Proteine durch das Fehlen von Pex5p misslokalisiert und Peroxisomen somit leichter und in geringeren Dichtebereichen

aufzufinden sind (88). Pex8p-ProtA war in den Fraktionen 21 und 23 schwach zu detektieren. In diesen Fraktionen der Dichte 1,13-1,11 g/cm³ sind alle löslichen Bestandteile zu detektieren. Allerdings ist eine Differenzierung von löslichen und membranassoziierten Bestandteilen in diesem Dichtebereich nicht möglich. Aufgrund der Detektion von Fox3p als auch von Pex13p in eben diesen Fraktionen ist daher nicht auszuschließen, dass Pex8p-ProtA membranassoziiert vorliegt. Dies machte eine nachfolgende Lokalisationsanalyse von Pex8p-ProtA in dieser Mutante durch diskontinuierlichen Flotationsgradienten nötig.

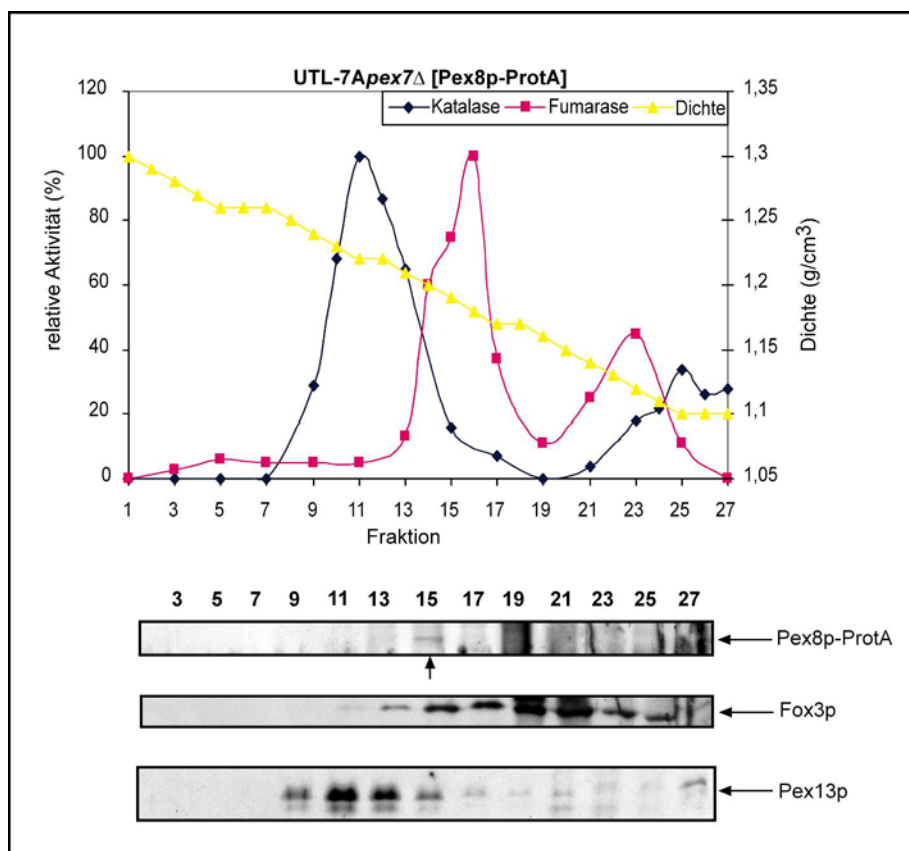


Abb. 3.20 Subzelluläre Fraktionierung des zellfreien Lysates von UTL-7A *pex7*Δ[Pex8p-ProtA] mittels eines kontinuierlichen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen 32-54%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

In UTL-7A *pex7*Δ[Pex8p-ProtA] entsprachen die Verteilungen von Katalase und Fumarase denen des Wildtyps. Trotz erheblicher Detektionsprobleme war eine

leichte Verschiebung von Pex8p-ProtA im Vergleich zum Wildtyp in einer Fraktion geringerer Dichte (Fraktion 15, $1,18 \text{ g/cm}^3$) auszumachen. Fox3p war durch das Fehlen des PTS2-Rezeptors nicht in den Fraktionen peroxisomaler Dichte zu detektieren, sondern in den Fraktionen 15-27 und hatte seine Maxima in den Fraktionen 19 und 21 ($1,14 \text{ g/cm}^3$). Pex13p hatte sein Maximum in Fraktion 11, konnte aber auch in weiteren Fraktionen (9-27) detektiert werden.

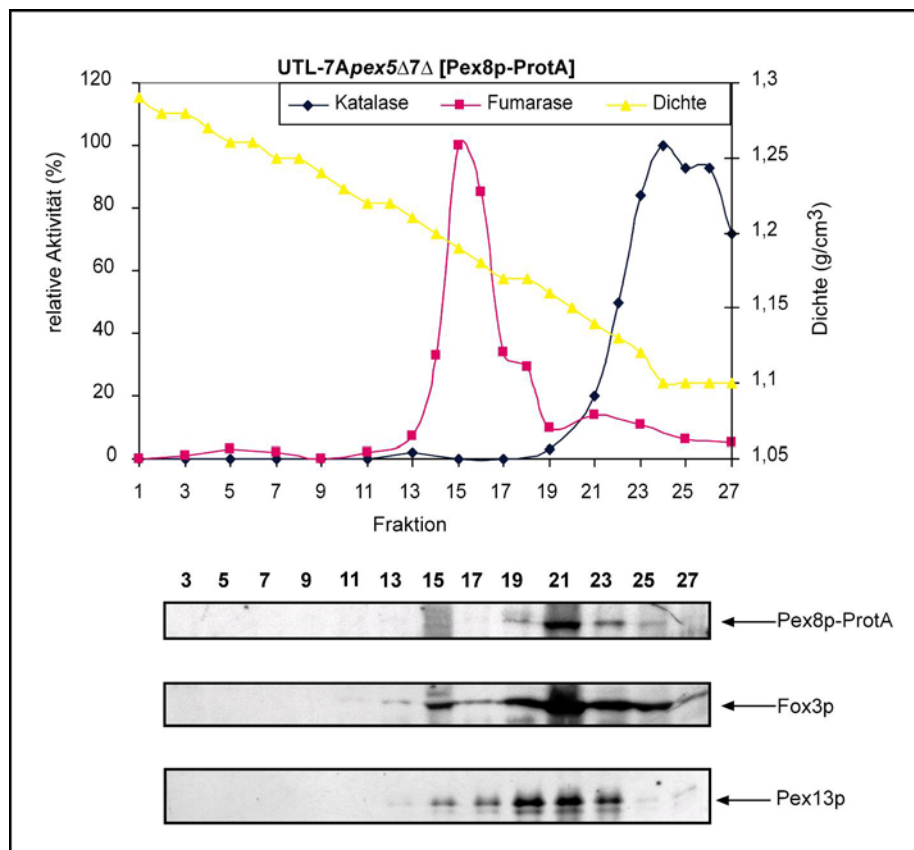


Abb. 3.21 Subzelluläre Fraktionierung des zellfreien Lysates von UTL-7A *pex5*Δ *pex7*Δ [Pex8p-ProtA] mittels eines kontinuierlichen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen 32-54%igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Während in UTL-7A *pex5*Δ *pex7*Δ [Pex8p-ProtA] die Katalase in der Fraktion 24 (Dichte $1,11 \text{ g/cm}^3$) ihr Maximum hatte, waren die jeweiligen Maxima der Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p in der Fraktion 21 (Dichte $1,13 \text{ g/cm}^3$) zu finden. Sie waren aber ebenfalls in weiteren Fraktionen zu identifizieren. Da

auch hier eine übereinstimmende Identifizierung von Pex8p-ProtA sowohl mit dem Membranprotein Pex13p, als auch mit der mislokalisierten Thiolase (Fox3p) auftrat, war keine eindeutige Aussage über eine cytosolische oder membranabhängige Lokalisation zu treffen und machte eine nachfolgende Lokalisationsanalyse von Pex8p-ProtA in dieser Mutante durch diskontinuierlichen Flotationsgradienten nötig.

Tabelle 3.4 fasst die Verteilungen der Leitenzyme und immunologischen Nachweise der Dichtegradientenzentrifugation der Zellen UTL-7A *pex5* Δ , UTL-7A *pex7* Δ , UTL-7A *pex5* Δ *pex7* Δ zusammen.

Tab. 3.4 Tabellarische Zusammenfassung der Lokalisationsanalyse des Proteins Pex8p-ProtA in UTL-7A, UTL-7A *pex5* Δ , UTL-7A *pex7* Δ , UTL-7A *pex5* Δ *pex7* Δ durch Dichtegradientenzentrifugation

	Enzymatische Messung relative Aktivität 100 % Fraktion [Nr.]/ Dichte [g/cm ³]		Immunologischer Nachweis Peakfraktionen , weitere Fraktionen		
	Katalase	Fumarase	Pex8p-ProtA	Pex13p	Fox3p
WT +	F 11	F 15	13, 27	11, 13	9-27
	D 1,23	D 1,18	11	21-27	11, 13
<i>pex5</i>Δ+	F 25	F 15	21, 23	15-27	11-27
	D 1,07	D 1,17		19	17-23
<i>pex7</i>Δ+	F 11	F 16	15	17-21	13-27
	D 1,22	D 1,17		11	19, 21
<i>pex5pex7</i>Δ+	F 24	F 15	19-25	15-23	19-23
	D 1,07	D 1,19	21	19, 21	21

+ = [Pex8p-ProtA]

3.11.2 Flotation

Bei der unter Kapitel 3.11.1 durchgeführten Dichtegradientenzentrifugation war eine eindeutige Trennung von membranösen Strukturen und cytosolisch vorliegenden Komponenten nicht möglich. Bei dieser Art der Dichtegradientenzentrifugation besteht die Möglichkeit, dass neben membranösen Strukturen auch cytosolische Proteinaggregate sedimentieren und somit in den Gradienten einwandern. Um diese Möglichkeit auszuschließen und eine eindeutige Aussage über die Lokalisation von Pex8p-ProtA – cytosolisch oder membrangebunden - in den untersuchten Mutanten treffen zu können, erfolgte eine Analyse der Lokalisation von Pex8p-ProtA in den verschiedenen Mutanten mittels diskontinuierlicher Flotationsgradienten. Grundlegend sind in einem diskontinuierlichen Flotationsgradienten Proteinaggregate und cytosolische Proteine nicht zur Flotation in den Gradienten befähigt und verbleiben am Boden des Gradienten. Daher wurde ein zellfreies Lysat (50%ig) mit 46%iger, 38%iger und 25%iger Saccharoselösung überschichtet und zentrifugiert. Peroxisomen und Mitochondrien konnten in den Gradienten entsprechend ihrer Dichte einwandern, genauso wie Peroxisomale Membranstrukturen, sogenannte „ghosts“, in der Lage waren, sich vom überschichteten zellfreien Lysat im Gradienten zu verteilen. „Ghosts“ befinden sich dann typischerweise in den oberen Fraktionen des diskontinuierlichen Flotationsgradienten (74). In den Abbildungen 3.22 bis 3.25 sind die biochemischen Analysen dargestellt.

In UTL-7A[Pex8p-ProtA] war die Peakfraktion des peroxisomalen Leitenzyms, der Katalase, in der Fraktion 9 bei einer Dichte von $1,21 \text{ g/cm}^3$ zu detektieren. Die Fumarase hatte in Fraktion 13 bei einer Dichte von $1,19 \text{ g/cm}^3$ ihr Maximum. Damit waren beide Enzyme im erwarteten Dichtebereich zu finden. Genauso hatten Fox3p und das peroxisomale Membranprotein Pex13p in den Fraktionen 9 und 11 ihr Maximum. Beide Proteine konnten auch geringfügig in Fraktionen geringerer Dichte detektiert werden. Pex8p-ProtA befand sich in den Fraktionen 5-13, sowie geringfügig in der Fraktion 15-27. Was die Verteilung der Leitenzyme des Stammes UTL-7A[Pex8p-ProtA] anbetrifft, kann dieser daher als Positivkontrolle dieser Analyse verwendet werden. Da alle analysierten Zellen wie UTL-7A[Pex8p-ProtA] behandelt wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl die Verteilung ihrer Leitenzyme Katalase und Fumarase als auch die

Verteilung der immunologisch nachgewiesenen Proteine Fox3p, Pex8p-ProtA und des Membranmarkers Pex13p einer *in vivo*-ähnlichen Verteilung entsprach.

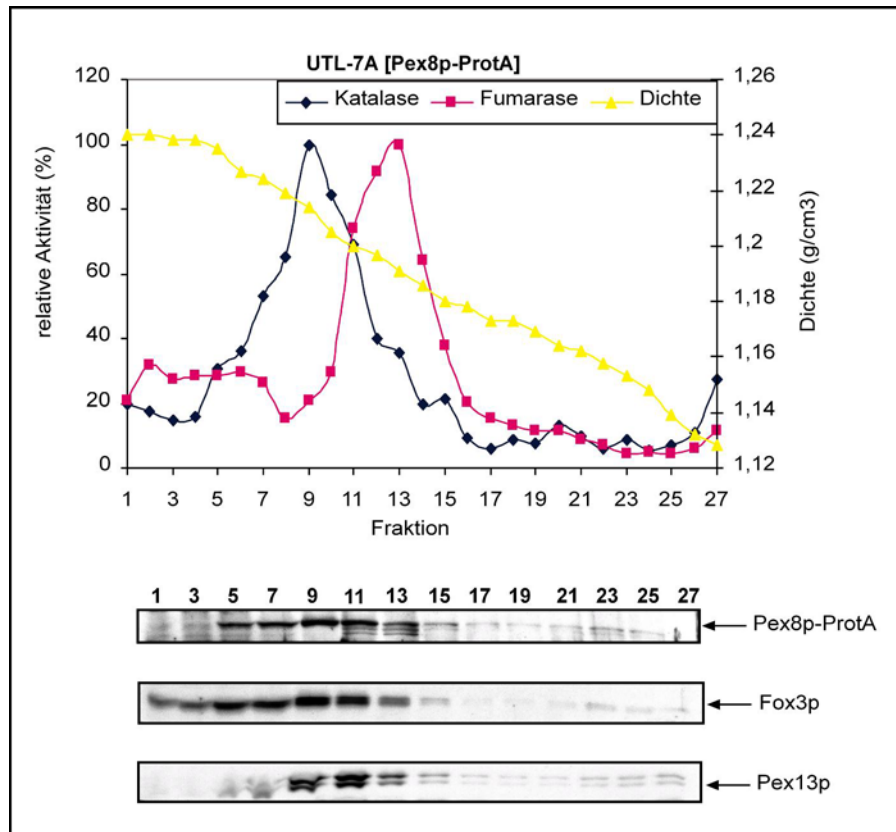


Abb. 3.22 Diskontinuierlicher Flotationsgradient des zellfreien Lysates von UTL-7A [Pex8p-ProtA]

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen diskontinuierlichen Flotationsgradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

In UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA] befand sich die Katalase in den Fraktionen 1-9 und hatte ihr Maximum in der Fraktion 3 bei einer Dichte von 1,24 g/cm³. Die Verteilung der Fumarase war mit derjenigen im Wildtyp vergleichbar.

Die Thiolase (Fox3p) befand sich ebenfalls in Fraktion 3 bei einer Dichte von 1,24 g/cm³. Obwohl ein Restimport von PTS2-Proteinen in peroxisomale Strukturen stattfindet (88), konnte Fox3p nicht in weiteren Fraktionen detektiert werden. Durch das Fehlen aller PTS1-Proteine sind Peroxisomen in geringeren Dichtebereichen aufzufinden. Dies zeigt die Verteilung des Membranmarkerproteins Pex13p, welches in den Fraktionen 5-27 detektierbar

war und seine Maxima in den Fraktionen 23-27 hatte. Offenbar ist die Konzentration der Fox3-Proteine in den Fraktionen geringerer Dichte unter der immunologischen Nachweisgrenze. Pex8p-ProtA war sowohl in den Fraktionen 1-5 also auch in den Fraktionen 23-27 zu detektieren. Aufgrund der Detektion von Fox3p als auch von Pex13p in eben diesen Fraktionen schien Pex8p-ProtA membranassoziiert vorzuliegen.

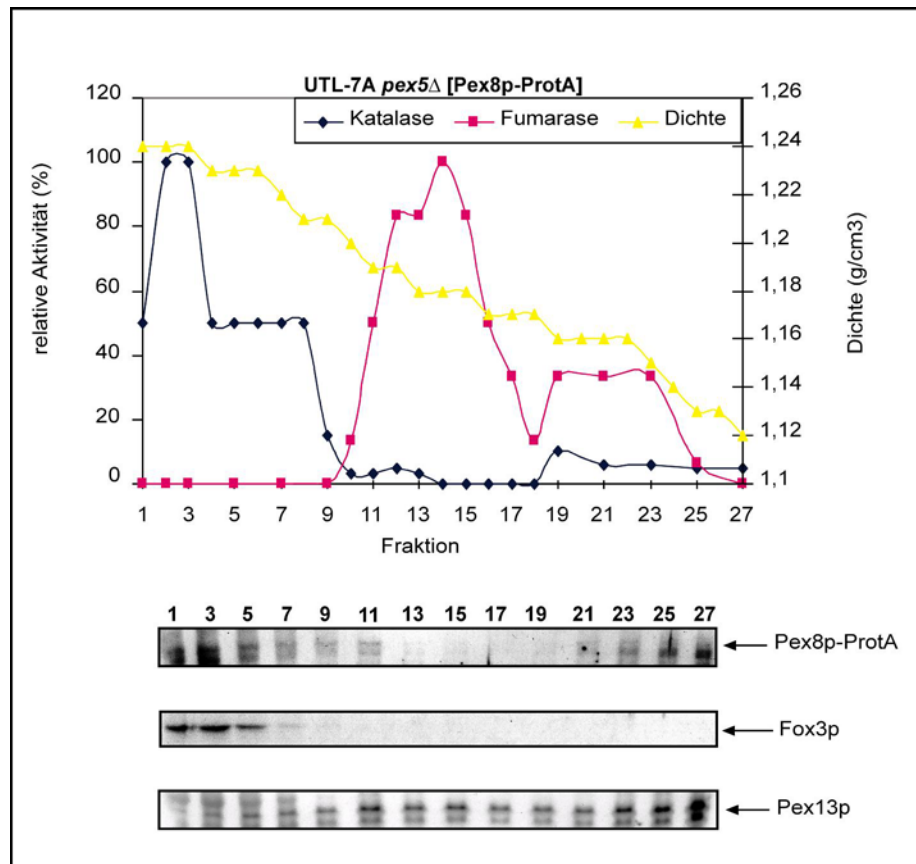


Abb. 3.23 Diskontinuierlicher Flotationsgradient des zellfreien Lysates von UTL-7A *pex5*Δ [Pex8p-ProtA]

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen diskontinuierlichen Flotationsgradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

In UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] verhielten sich die Verteilungen der Katalase und Fumarase im jeweiligen Dichtebereich vergleichbar mit dem Wildtyp (siehe Abb. 3.22). Fox3p war durch das Fehlen des PTS2-Rezeptors ausschließlich in den Fraktionen 1-7 zu detektieren. Pex8p-ProtA konnte hingegen sowohl in den Fraktionen 1-13, als auch in den Fraktionen 21-27 detektiert werden, was auf eine Bindung an Membranstrukturen schließen lässt. In diesem Bereich ließ sich auch in geringen Spuren Pex13p als Membranmarker identifizieren. Dessen Peakbereich waren allerdings die Fraktionen 11-13.

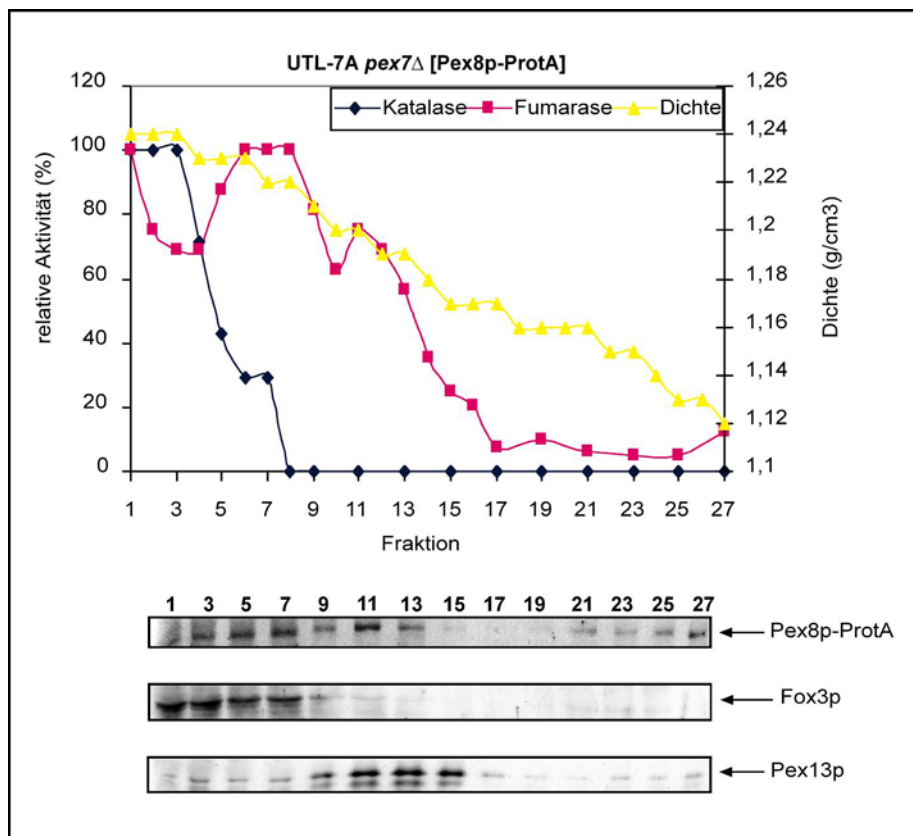


Abb. 3.24 Diskontinuierlicher Flotationsgradient des zellfreien Lysates von UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA]

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen diskontinuierlichen Flotationsgradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

In UTL-7A *pex5* Δ *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] hatte die Katalase ihr Maximum in der Fraktion 4 (Dichte 1,22 g/cm³), Fox3p in Fraktion 1 und 3. Beide Proteine lagen misslokalisiert im Cytosol vor und flotierten daher nicht in den Gradienten hinein. Pex8p-ProtA war in allen Fraktionen des Gradienten zu finden, besonders in den Fraktionen 21-27, befand sich also auch in der Doppeldeletionsmutante an Membranstrukturen gebunden. Genauso ist Pex13p in allen Fraktionen des Gradienten vertreten, besonders im Bereich der Fraktionen 5-21, schwach nur in den Fraktionen 23-27. Dies deutet darauf hin, dass in dieser Mutante Membranstrukturen mit daran gebundenen Proteinen existieren. Die Tatsache, dass Pex8p-ProtA in Fraktionen geringerer Dichte zu finden ist, deutet an, dass es sich hierbei um kleinere Membranstrukturen handelt, auf denen Pex13p nicht sehr stark vertreten ist. Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse der Flotationsanalyse zusammen.

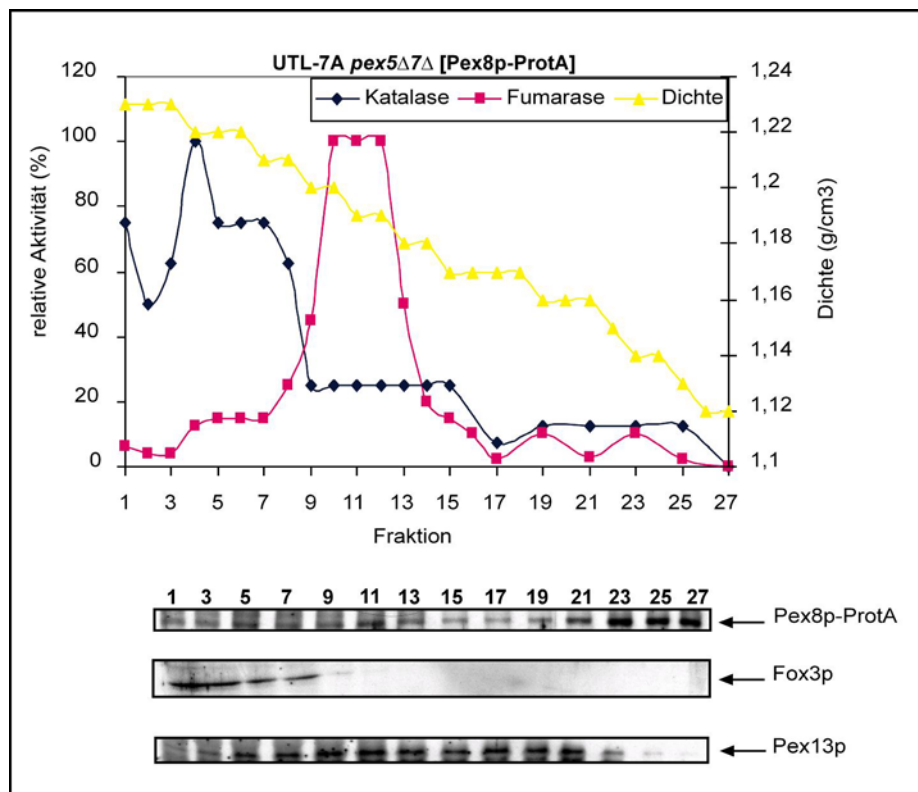


Abb. 3.25 Diskontinuierlicher Flotationsgradient des zellfreien Lysates von UTL-7A *pex5* Δ *pex7* Δ [Pex8p-ProtA]

Ein zellfreies Lysat aus Ölsäure-induzierten Zellen wurde durch einen diskontinuierlichen Flotationsgradienten aufgetrennt und immunologisch auf die Verteilung der peroxisomalen Proteine Pex8p-ProtA, Fox3p und Pex13p analysiert. Der Nachweis der peroxisomalen Katalase und mitochondrialen Fumarase erfolgte durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Tab. 3.5 Tabellarische Zusammenfassung der Lokalisationsanalyse des Proteins Pex8p-ProtA in UTL-7A, UTL-7A *pex5* Δ , UTL-7A *pex7* Δ , UTL-7A *pex5* Δ *pex7* Δ durch diskontinuierliche Flotationsgradientenzentrifugation

	Enzymatische Messung relative Aktivität 100 % Fraktion [Nr.]/ Dichte [g/cm ³]		Immunologischer Nachweis Peakfraktionen, weitere Fraktionen		
	Katalase	Fumarase	Pex8p-ProtA	Pex13p	Fox3p
WT +	F 9	F 13	5-27	5-27	1-27
	D 1,21	D 1,19	9	9, 11	9, 11
<i>pex5</i>Δ+	F 3	F 14	1-11, 23-27, 3	3-27	1-5
	D 1,24	D 1,18		27	3
<i>pex7</i>Δ+	F 3	F 8	1-13, 21-27	3-15	1-7
	D 1,23	D 1,22	11	13	3
<i>pex5pex7</i>Δ+	F 4	F 11	1-27	3-27	1-7
	D 1,23	D 1,19	23-27		1, 3

+ = [Pex8p-ProtA]

3.12 Limitierte Proteolyse von Pex8p-ProtA in UTL-7A und den Mutanten UTL-7A *pex5* Δ und UTL-7A *pex7* Δ

Da Pex8p-ProtA im diskontinuierlichen Flotationsgradienten in den untersuchten Mutanten UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA] und UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] an membranösen Strukturen detektierbar war, sollte die Zugänglichkeit von Proteinase K zu Pex8p-ProtA untersucht werden. Proteinase K ist eine endolytische Protease aus *Tritirachium album limber*, die Peptidbindungen an den Carboxygruppen von aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren schneidet. Der Vergleich der Mutanten zum Wildtyp sollte Aufschluss darüber geben, ob das Fehlen der Rezeptoren eine Auswirkung auf die Zugänglichkeit von Pex8p-ProtA für die Proteinase K hatte. Dazu wurden zellfreie Lysate der Stämme UTL-7A[Pex8p-ProtA], UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA] und UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] einer differentiellen Zentrifugation unterzogen und das Sediment in einem geringen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert. Aliquots wurden sowohl ohne als auch mit 0,1 % Triton x 100 behandelt und variierende Konzentrationen Proteinase K zugesetzt.

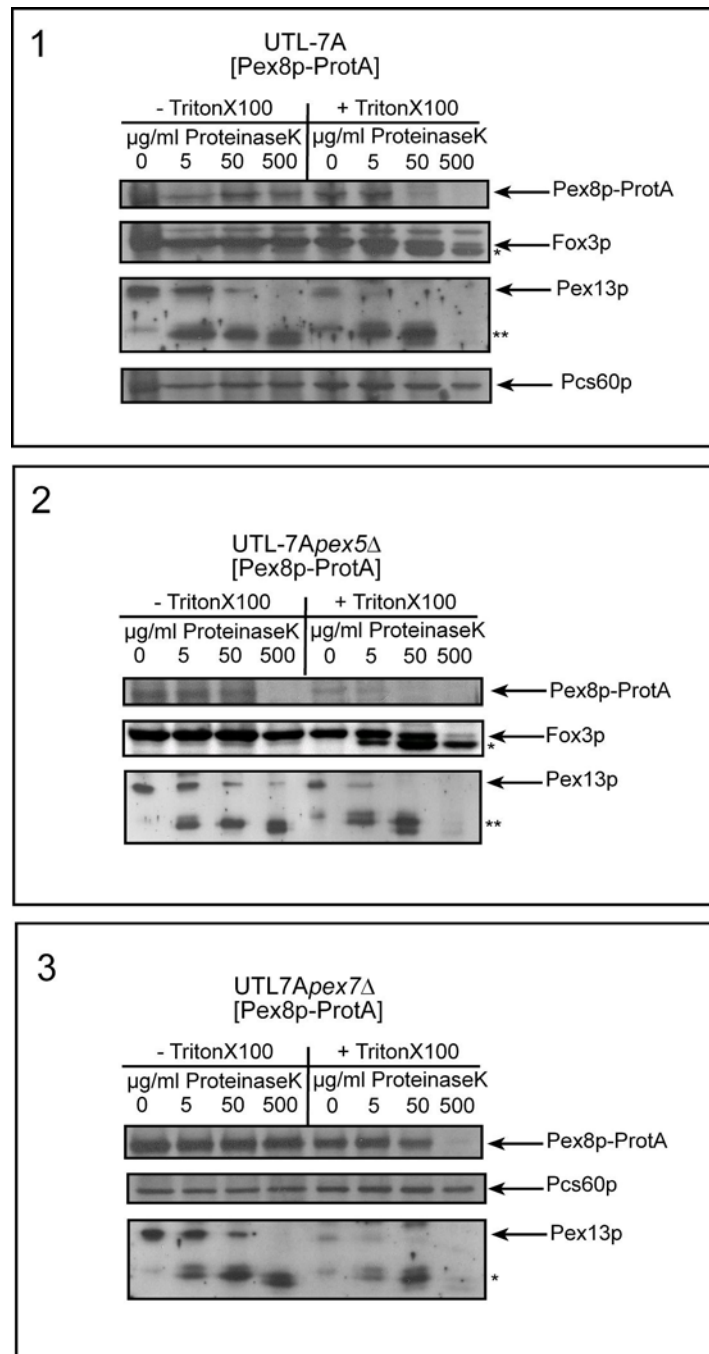


Abb. 3.26 Limitierte Proteolyse von Pex8p-ProtA mittels Proteinase K

Die partikulären Fraktionen aus differentiellen Zentrifugationen zellfreier Lysate der Stämme UTL-7A [Pex8p-ProtA], UTL-7A *pex5Δ*[Pex8p-ProtA] und UTL-7A *pex7Δ*[Pex8p-ProtA] wurden unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von Proteinase K inkubiert. Dieser limitierte Verdau wurde sowohl ohne als auch mit 0,1% Triton x 100 durchgeführt. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit den angezeigten Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL Systems detektiert.

Zunächst werden die unter ohne Triton x 100 aufgeführten Untersuchungen beschrieben. Pex8p-ProtA wurde im Stamm UTL-7A [Pex8p-ProtA] unter Abwesenheit von Triton x 100 nicht abgebaut. Pex8p-ProtA war für die

Proteinase K nicht zugänglich und wurde erst durch die Zugabe von Triton x 100 durch Proteinase K abgebaut. Als Kontrollen dienten Fox3p, das als Matrixprotein unter diesen Bedingungen für die Proteinase K nicht zugänglich ist. Pcs60p, intraperoxisomales peripheres Membranprotein mit PTS1-Signal am C-Terminus, war ebenfalls durch die Protease nicht abbaubar (12). Pex13p verhielt sich unter diesen Bedingungen erwartungsgemäß (74). Die cytosolischen Anteile des integralen Membranproteins waren für Proteinase K zugänglich und wurden abgebaut. Es zeigte sich eine charakteristische Abbaubande, die nicht weiter durch die Protease verdaut werden konnte und den, durch die Membran geschützten Teil des Proteins darstellte.

In der Mutante UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA] konnte Pex8p-ProtA unter den ohne Triton x 100 gewählten Bedingungen bereits durch die Proteinase K abgebaut werden. Bei einer Konzentration von 500 μ g/ml Proteinase K war Pex8p-ProtA nicht mehr detektierbar. Alle Kontrollen, Pex13p und Fox3p, verhielten sich wie unter Wildtypbedingungen.

In der Mutante UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] verhielten sich Pex8p-ProtA und die jeweiligen Kontrollen Pcs60p und Pex13p wie unter Wildtypbedingungen.

Bei den unter mit 0,1 % Triton x 100 beschriebenen Bedingungen wurde deutlich, dass Pex8p-ProtA in Stamm UTL-7A [Pex8p-ProtA] unter Anwesenheit von Triton x 100 ab einer Konzentration von 50 μ g/ml Proteinase K abgebaut wurde und bei einer Konzentration von 500 μ g/ml nicht mehr detektierbar war. Pex13p wurde ebenfalls vollständig abgebaut, während Fox3p ein bekanntes Abbauprodukt bildete. Pcs60p blieb resistent gegenüber der Proteasebehandlung. Pex8p-ProtA verhielt sich im Stamm UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] wie unter Wildtypbedingungen und wurde erst bei 500 μ g/ml abgebaut. In UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA] konnte Pex8p-ProtA bereits ab einer Konzentration von 5 μ g/ml Proteinase K abgebaut werden.

Zusammenfassend dargestellt verhielt sich Pex8p-ProtA in UTL-7A [Pex8p-ProtA] und UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] wie ein durch die peroxisomale Membran oder durch weitere Proteinkomponenten geschütztes peroxisomales Membranprotein. In UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA] war Pex8p-ProtA für die Protease zugänglich. In Tabelle 3.6 werden die Daten aus Abbildung 3.26 zusammengefasst aufgeführt.

Tab. 3.6 Tabellarische Zusammenfassung der limitierten Proteolyse von Pex8p-ProtA mittels Proteinase K

		ohne Triton x 100				mit Triton x 100			
		Proteinase K [$\mu\text{g/ml}$]				Proteinase K [$\mu\text{g/ml}$]			
AK	[Pex8p-ProtA]	0	1	10	100	0	1	10	100
Pex8p-ProtA	WT	+	+	+	+	+	+	(+)	-
	<i>pex5</i> Δ	+	+	(+)	-	+	(+)	-	-
	<i>pex7</i> Δ	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Pex13p	WT	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	-
	<i>pex5</i> Δ	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	-
	<i>pex7</i> Δ	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	-
Fox3p	WT	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
	<i>pex5</i> Δ	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
Pcs60p	WT	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>pex7</i> Δ	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = kein Abbau, (+) = leichter Abbau, - = Abbau, AK=Antikörper

3.13 Analyse der Membranassoziation von Pex8p-ProtA in den Mutanten UTL-7A *pex5* Δ , UTL-7A *pex7* Δ und im Wildtypen UTL-7A

In diskontinuierlichen Flotationsgradienten von UTL-7A *pex5* Δ [Pex8p-ProtA], UTL-7A *pex7* Δ [Pex8p-ProtA] und UTL-7A[Pex8p-ProtA] war es möglich Pex8p-ProtA in Fraktionen geringerer Dichte zu detektieren (3.11.2). Dies deutete auf eine Membranassoziation des Proteins hin. In der limitierten Proteolyse war Pex8p-ProtA im Stamm UTL-7A *pex5* Δ für die Proteinase K zugänglich, während das Protein in UTL-7A *pex7* Δ und UTL-7A nicht verdaut werden konnte. Um daher die Membranassoziation von Pex8p-ProtA in den verschiedenen Stämmen zu untersuchen, erfolgte eine Extraktionsanalyse der Organellensedimente. Ölsaure-induzierter Zellen wurden wie unter 2.12 beschrieben aufgearbeitet und ihre Organellensedimente unter verschiedenen pH- und Salzbedingungen auf die Extraktionsmöglichkeit von Matrixproteinen und Membranproteinen untersucht (27). Peroxisomale Matrixproteine werden durch hypotonische Lyse mittels Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris/HCL pH 8,0), schwach mit der Membran assoziierte Proteine durch Hochsalzpuffer (10 mM Tris/HCL pH 8,0, 500 mM KCl) freigesetzt und finden sich nach anschließender Zentrifugation im Überstand. Eine Extraktion der Membranen des Sediments mit Na₂CO₃ pH 11,5 bewirkt, dass sich periphere

Membranproteine nach der Zentrifugation im Überstand befinden, während integrale Proteine weiterhin im Sediment verbleiben (137). In Abbildung 3.27 ist diese Extraktionsanalyse dargestellt.

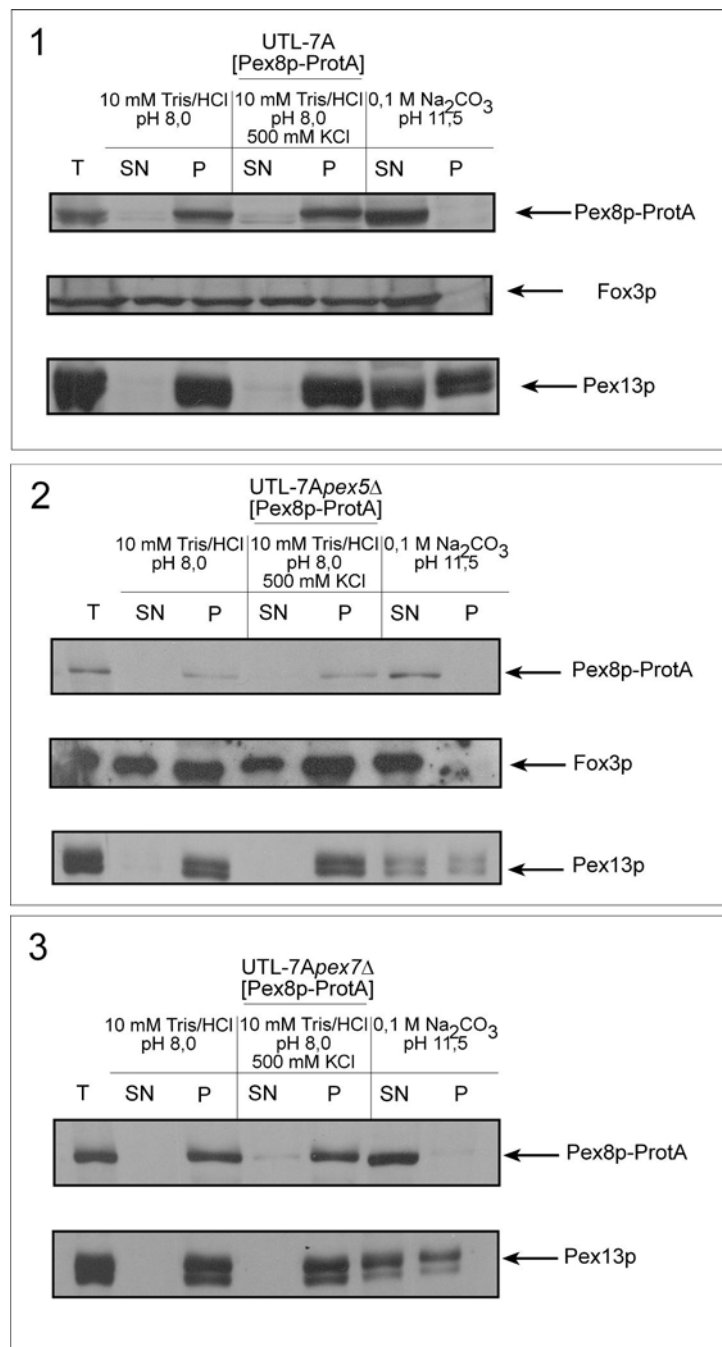


Abb. 3.27 Extraktion von Matrix- und Membranproteinen aus Membranen von UTL-7A *pex5Δ*[Pex8p-ProtA], UTL-7A *pex7Δ*[Pex8p-ProtA] und UTL-7A[Pex8p-ProtA]

Nach differentieller Zentrifugation werden die Sedimente der bezeichneten Stämme parallel mit Puffern wie unter **1**, **2**, **3** bezeichnet behandelt und durch Zentrifugation in Sediment (P) und Überstand (SN) aufgetrennt. Die Extraktion wird wiederholt und die Überstände beider Zentrifugationen vereint. Zur immunologischen Detektion der peroxisomalen Proteine wurden gleiche Volumenanteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Nitrozellulose wurde mit den angezeigten Antikörpern inkubiert und Immunkomplexe unter Verwendung des ECL Systems detektiert. SN = Überstand; P = Pellet

In allen drei untersuchten Stämmen konnte Pex8p-ProtA weder durch 10 mM Tris/HCL pH 8.0 noch durch 10 mM Tris/HCL pH 8.0, 500 mM KCl nennenswert aus den Membranen extrahiert werden. Das integrale Membranprotein Pex13p verhielt sich genauso, während das Matrixprotein Fox3p durch beide Puffer extrahierbar war, d. h. aus der peroxisomalen Matrix entlassen wurde. Hierbei ist zu beachten, dass ein nicht geringfügiger Teil des Proteins nach erfolgter Extraktion und anschließender Zentrifugation erneut sedimentierbar war. Pex8p-ProtA war erst durch Na₂CO₃ pH 11,5 aus der Membran extrahierbar. Dies deutet auf ein peripheres Membranprotein hin. Allerdings ließ sich Pex13p ebenfalls zu einem Teil aus der peroxisomalen Membran extrahieren.

Aufgrund dieser Tatsache lässt sich sagen, dass Pex8p-ProtA in allen Mutanten unterschiedslos gleich stark mit der peroxisomalen Membran assoziiert ist und sich durch Na₂CO₃ pH 11,5 stärker aus der peroxisomalen Membran extrahieren lässt als das integrale Membranprotein Pex13p.

Tab. 3.7 Tabellarische Zusammenfassung der Extraktion von Matrix- und Membranproteinen aus Membranen von UTL-7A *pex5Δ*[Pex8p-ProtA], UTL-7A *pex7Δ*[Pex8p-ProtA] und UTL-7A[Pex8p-ProtA]

			1		2		3	
			10 mM Tris/HCl pH 8		10 mM Tris/HCl pH 8 ; 500mM KCl		0,1 M Na ₂ CO ₃ pH 11,5	
	[Pex8p-ProtA]	Gesamt	SN	P	SN	P	SN	P
Pex8p-ProtA	WT	+	-	+	(-)	+	+	(-)
	<i>pex5Δ</i>	+	-	+	(-)	+	+	(-)
	<i>pex7Δ</i>	+	-	+	(-)	+	+	(-)
Pex13p	WT	+	(-)	+	(-)	+	+	+
	<i>pex5Δ</i>	+	-	+	-	+	+	+
	<i>pex7Δ</i>	+	-	+	-	+	+	+
Fox3p	WT	+	+	+	+	+	+	-
	<i>pex5Δ</i>	+	+	+	+	+	+	-

+ = Extraktion, (-) = schwache Extraktion, - = keine Extraktion, SN = Überstand, P = Pellet