

Kartierung der
Interaktionen peroxisomaler Membranproteine
*in **Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jörg H. Eckert
aus München

Druck: Copy Team Cologne, Köln
2001

Berichterstatter:

Herr Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson

Herr Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung:

29.11.2001

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Das Peroxisom.....	2
1.1.1 Morphologie, Stoffwechsel und Pathologie	2
1.1.2 Biogenese von Peroxisomen.....	4
1.1.3 Import peroxisomaler Matrixproteine	7
1.2 Die Split-Ubiquitin-Methode.....	11
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.1.2 Antikörper.....	15
2.1.3 Antibiotika	15
2.1.4 Molekulargewichtsstandard für Proteine.....	16
2.1.5 Oligonukleotide	16
2.1.6 Kulturmedien.....	19
2.1.7 Bakterienstämme	21
2.1.8 Hefestämme	21
2.1.9 Vektoren.....	23
2.1.10 Licht- und Fluoreszenzmikroskop	23
2.1.11 Sonstige bildgebende Verfahren.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNS aus <i>S. cerevisiae</i>	24
2.2.1.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> ("Minipräp")	24
2.2.1.3 Enzymatische Behandlung von DNS	25
2.2.1.4 Kompetente Zellen und Transformation in <i>E. coli</i>	26
2.2.1.5 Kompetente Zellen und Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	27
2.2.1.6 Homologe Rekombination.....	28
2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.1.9 Elution von DNS aus Agarosegelen.....	29
2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNS.....	29
2.2.1.11 Extraktion von DNS	29
2.2.1.12 Fällung von DNS	29
2.2.1.13 Sequenzierung von DNS	30
2.2.1.14 Konstruktion der verwendeten Vektoren.....	30
2.2.1.15 Deletion eines Gens im Hefegenom.....	37
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.2.1 Gesamtproteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	39
2.2.2.3 SDS-PAGE	40
2.2.2.4 Western Blot Analyse	40
2.2.2.5 Koimmunopräzipitation peroxisomaler Membranproteine	41
2.2.2.6 Chemische Kreuzvernetzung.....	42
2.2.3 Zellbiologische Methoden.....	44
2.2.3.1 Physiologische Wachstumstests (Interaktionstests)	44
2.2.3.2 Two-Hybrid-Interaktionstest	45

2.2.3.3	Ölsäure-Wachstumstests.....	45
2.2.3.4	Mikroskopie mit Grün-Fluoreszierendem Protein.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Rational der Arbeit	47
3.2	Funktionalitätstests der Fusionsproteine	47
3.2.1	Wachstum auf Ölsäure	47
3.2.2	Import von GFP-SKL.....	50
3.2.3	Funktionalität und Lokalisation der Kontrollproteine	52
3.3	Erstellung der Split-Ub-Interaktionskarte der Peroxine	53
3.3.1	Untersuchungen an putativen Komponenten des Translokons - Pex12p	53
3.3.1.1	Pex12-Cub-RUra3p	53
3.3.1.2	Charakterisierung der Bindungsdomänen von Pex12p	57
3.3.1.3	Das Bindungsverhalten von Pex12-Cub-RUra3p in <i>pex</i> -Deletionsst.....	59
3.3.2	Pex10p	61
3.3.2.1	Pex10-Cub-RUra3p	61
3.3.2.2	Charakterisierung der Bindungsdomänen von Pex10p	62
3.3.2.3	Das Bindungsverhalten von Pex10-Cub-RUra3p in <i>pex</i> -Deletionsst.....	63
3.3.3	Pex4p	64
3.3.3.1	Pex4-Cub-RUra3p	64
3.3.4	Pex22p	66
3.3.4.1	Pex22-Cub-RUra3p	66
3.3.5	Pex2p	67
3.3.6	Pex11p	68
3.3.6.1	Pex11-Cub-RUra3p	68
3.3.7	Die mittels des Split-Ub-Systems erstellte Interaktionskarte der Peroxine	69
3.4	Bestätigung neuer Interaktionen durch alternative Techniken.....	72
3.4.1	Die Interaktionen von Pex10p	72
3.4.1.1	Koimmunopräzipitationen belegen Interaktionen von Pex10p mit Pex10p und Pex12p	72
3.4.1.2	Koimmunopräzipitationen von Pex10p mit Pex10p in <i>pex</i> - Deletionsstämmen	74
3.4.2	Die Nähe von Pex4p zu Pex4p	75
3.4.2.1	Die Nähe von Pex4-Cub-RUra3p zu NuI-Pex4 ist spezifisch.....	75
3.4.2.2	Pex4p kann nicht mit Pex4p koimmunopräzipitiert werden	76
3.4.2.3	Pex4p kann durch chem. Kreuzvernetzung mit Pex4p präzipitiert werden	76
3.4.2.4	Pex4p und Pex4p interagieren im Two-Hybrid-Test nicht miteinander	77
3.5	Untersuchung spezifischer Fragestellungen mit Hilfe des Split-Ub in <i>pex</i> - Deletionsmutanten.....	78
3.5.1	Gibt es zwei Transkripte von PEX2, die unterschiedlich lokalisiert werden?	78
3.5.2	Untersuchungen zur Interaktion von Pex11p	80
3.5.2.1	Dimerisiert Pex11p auch in Abwesenheit der peroxisomalen Membran?	80
3.5.3	Visualisation der Dimerisation von Pex11p in der lebenden Zelle	81
3.5.4	Ist die Interaktion von NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p von Pex22p abhängig?.....	83
3.5.5	Kann die Reihenfolge von Bindungsereignissen von Pex5p an seine Rezeptoren in der peroxisomalen Membran mittels Split-Ub detektiert werden?	84
3.6	Anwendungen.....	86
3.6.1	Lokalisation von Proteinen in der lebenden Zelle am Beispiel von Ady2p.....	86
3.6.2	Suche nach Bindungspartnern von Proteinen.....	88
3.6.2.1	Rational des Split-Ub-Verfahrens zur Suche nach Bindungspartnern.....	88
3.6.2.2	Das Zielprotein Pex3-Cub-RUra3p	90

3.6.2.3	Ergebnisse und Fehleranalyse	91
4	Diskussion	94
4.1	Untersuchung der Interaktionen peroxisomaler Membranproteine mit dem Split-Ubiquitin-System.....	94
4.2	Eine Split-Ub basierte Interaktionskarte der Peroxine	95
4.3	Erkenntnisse über den putativen Translokationskomplex des Peroxisoms	99
4.3.1	Der Rezeptorbindungskomplex.....	99
4.3.2	Der putative Translokationskomplex	100
4.3.2.1	Orientierung und molekulare Anatomie von Pex12p	101
4.3.3	Interaktion zwischen Rezeptorbindung- und Translokationskomplex.....	102
4.3.4	Der Pex4p-Pex22p-Pex10p-Pex12p-Subkomplex – Spielt Ub eine Rolle? ...	102
4.3.5	Pex2p	105
4.3.6	Ist Pex15p eine integr. Komp. des Translokationsapp., aber Pex19p nicht?..	105
4.3.7	Pex3p - Ein frühes Peroxin im ER und Teil des Translokons?	107
4.3.7.1	Genomweite Suche nach Interaktionspartnern von Pex3p.....	108
4.4	Protein-Protein-Interaktionen außerhalb des Translokationskomplexes	108
4.4.1	Pex11p	108
4.5	Lokalisationsstudien.....	110
4.6	Ausblick.....	111
5	Zusammenfassung	112
6	Zusammenfassung in englischer Sprache (Abstract)	113
7	Literaturverzeichnis	114

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

3AT	3'-Aminotriazol
Ac	Acetat
AmAc	Ammoniumacetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (von engl. bovine serum albumen)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa, etwa
CoA	Coenzym A
Cub	C-terminale Hälfte des Ubiquitin
CuP	Promotorregion des <i>CUP1</i> -Gens
Da	Dalton (Molekulargewicht von Proteinen)
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribunukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym (UBC)
E3	Substrat-Erkennungsprotein für die Ubiquitinierung (Recognin)
ECL	verstärktes Chemolumineszenzsystem (von engl. enhanced chemoluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EUROSCARF	European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis, Frankfurt/Main
evtl.	eventuell
gen.	genomisch
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
<i>H. polymorpha</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i> (Mensch)
ha	Epitop aus dem Hüllprotein des Influenza-Virus (ha für „Hämagglutinin“)
HBST	HEPES gepufferte Salzlösung mit Tween 20
HEPES	4-(2-Hydroxyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IRS	infantiles Refsum-Syndrom
kb	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton (1000 Dalton)
LB	Luria-Bertani (Medium)

LiAc	Lithiumacetat
min	Minuten
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
NAD ⁺	Nicotinamidadeninukleotid (oxidierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadeninukleotidphosphat (oxidierte Form)
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
NEM	N-ethylmaleimid
Nua	N-terminale Hälfte des Ubiquitin; Alanin an Position 13
Nub	N-terminale Hälfte des Ubiquitin (Nui, Nua und Nug)
Nug	N-terminale Hälfte des Ubiquitin; Glycin an Position 13
Nui	N-terminale Hälfte des Ubiquitin; Isoleucin an Position 13 (Wildtyp)
OD _{nm}	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge (nm)
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBDs	peroxisomale Biogenesestörungen (engl. peroxisomal biogenesis disorders)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PMet	Promotorregion des <i>MET14</i> -Gens
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceaus-S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
PTS1 / PTS2	Peroxisomale Zielsteuerungssequenz (engl. peroxisomal targeting sequence)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rCDP	rhizomeler Typ des Chondrodysplasia-punctata-Syndroms
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RUra3p	Orothidin-5'-phosphat-Decarboxylase mit N-terminalem Arginin
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetisches Tröpfelmedium (engl. synthetic dropout)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	<i>Src</i> Homologie 3
TEMED	N-,N-,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tween [®] 40	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
U	Einheiten (engl. units) für die Aktivität von Restriktionsenzymen
Ub	Ubiquitin
Ubc	Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2)
Ubp(s)	Ubiquitin spezifische Protease(n)
üN	über Nacht

UTR	nicht translatierte Region (engl. untranslated region)
WT	Wildtyp
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
ZS	Zellweger-Syndrom

Weiterhin finden die Einheiten und Abkürzungen des Système International d'Unités (SI) Verwendung.

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt.

Die Schreibweise der Proteine und Gene richtet sich nach der gängigen Nomenklatur für Hefen. Bei Fusionsproteinen wird auf den Zusatz „p“ verzichtet, soweit aus der Schreibweise der einzelnen Komponenten eindeutig ersichtlich ist, dass es sich um ein Protein handelt.

In der vorliegenden Arbeit werden einige gängige Fachausdrücke aus dem Englischen übernommen, soweit eine deutsche Entsprechung nicht vorliegt oder nicht gebräuchlich ist. Dies geschieht, um Unklarheiten zu vermeiden.

1 Einleitung

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeichnet sich wie alle eukaryotischen Zellen durch ein komplexes System von Membranen aus. Während die Plasmamembran die Zelle nach außen hin abgrenzt, unterteilen intrazelluläre Membranen die Zelle in unterschiedliche Kompartimente. Jedes dieser Membransysteme besitzt eine charakteristische und zugleich dynamische Zusammensetzung aus Lipid- und Proteinkomponenten, die es dem jeweiligen Kompartiment ermöglichen, ganz bestimmte Funktionen wahrzunehmen. Während in den letzten Jahren viele spezifische Aufgaben und Funktionsmechanismen einzelner Membransysteme und viele der molekularen Ursachen ihrer typischen Lipid- und Proteinzusammensetzung aufgeklärt wurden, blieb das Wissen über die Peroxisomen, verglichen mit anderen Kompartimenten, nur sehr oberflächlich. Obwohl die „spherischen oder ovalen Körper“ schon Anfang der 50er Jahre beobachtet und im Anschluss sorgfältig biochemisch analysiert wurden (De Duve und Baudhuin, 1966), dauerte es bis Ende der 80er Jahre, bevor ihre Bedeutung im Stoffwechsel der Zelle - vor allem im Zusammenhang mit menschlichen Krankheitsbildern – wirklich erkannt wurde (De Duve, 1996). Erst in den letzten zehn Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen die Zellbiologie des Peroxisoms intensiv untersucht. Dennoch konnten bislang zwei grundlegende Fragen nicht beantwortet werden: wie entstehen Peroxisomen und wie gelangen Matrixproteine in den Innenraum und peroxisomale Membranproteine in die Membran des Peroxisoms (Kunau, 1998; Holroyd und Erdmann, 2001)? Während die ersten Komponenten des Peroxisoms vor allem durch Studien an von Patienten gewonnenen Gewebeproben identifiziert wurden, gewannen später CHO-Zelllinien (Chinese hamster ovary) und Hefen als Modellorganismen große Bedeutung für die Erforschung peroxisomaler Proteine. Ein besonderer Vorzug von *Saccharomyces cerevisiae* (und anderen Hefen wie *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* und *Pichia pastoris*) als Modellorganismus bestand darin, dass diese Hefe funktionelle Peroxisomen für das Wachstum auf bestimmten Kohlenstoffquellen wie etwa Ölsäure benötigt, während Peroxisomen für das Wachstum auf Medien mit Glukose verzichtbar sind (Erdmann *et al.*, 1989). Diese einfache Suche nach Hefezellen, die nicht mehr auf Fettsäure-Medien wachsen konnten und die somit Mutationen in Genen trugen, die für die Funktion des Peroxisoms essentiell sind, führte zur Identifizierung zahlreicher peroxisomaler Membranproteine (Subramani, 1998; Terlecky *et al.*, 1996).

1.1 Das Peroxisom

1.1.1 Morphologie, Stoffwechsel und Pathologie

Peroxisomen werden in nahezu allen eukaryotischen Zellen gefunden und gehören zusammen mit den Glyoxysomen der Pflanzen und den Glycosomen der Trypanosomen zur Organellfamilie der „Microbodies“. Sie werden von nur einer Membran begrenzt und sind von zumeist sphärischer Form mit einem Durchmesser von 0,1-1 μm . Im Gegensatz zu Mitochondrien enthalten Peroxisomen keine eigene DNS. Ihre Zahl variiert erheblich zwischen einigen wenigen wie zum Beispiel in Zellen von *S. cerevisiae* und einigen Hunderten oder sogar Tausenden in Hepatocyten von Säugern. Die Matrix der Peroxisomen fällt durch ihre elektronendichte und proteinreiche Struktur auf und ist daher vor allem in der Elektronenmikroskopie leicht zu identifizieren. Eine klar definierbare Strukturierung der Matrix konnte bislang nicht beobachtet werden (Schweiger und Kostka, 1981).

Die peroxisomale Membran ist offenbar für die meisten Moleküle undurchlässig, so auch für NAD^+ , Acetyl-CoA, NADP^+ und Protonen (Henke *et al.*, 1998; van Roermund *et al.*, 1998; Dansen *et al.*, 2000). Zusammen mit der spezifischen Proteinzusammensetzung des Kompartiments wird ein chemisch und enzymatisch einzigartiges Mikromilieu in der Zelle geschaffen. Allen Peroxisomen ist gemeinsam, dass sie mindestens über eine Wasserstoffperoxid-produzierende Oxidase und eine diese Peroxide zersetzende Katalase verfügen (Lazarow und Fujiki, 1985). Ansonsten weisen Peroxisomen in verschiedenen Spezies, Geweben und unter verschiedenen Umweltbedingungen ein hohes Maß an Variabilität in ihren metabolischen Funktionen und entsprechend auch in ihrer Proteinzusammensetzung auf (Tolbert, 1981; Subramani, 1993; Wanders und Tager, 1998; Geraghty *et al.*, 1999). So findet in Hefen beispielsweise die Biosynthese von Lysin in den Peroxisomen statt, zudem der Abbau verschiedener Aminosäuren, von Wasserstoffperoxiden und Methanol, die β -Oxidation von Fettsäuren und zumindest ein Teil der Reaktionen des Glyoxylatzyklus. Im Gegensatz dazu synthetisieren die Peroxisomen humaner Zellen Ether-Phospholipide (die sogenannten Plasmalogene), Cholesterol, Gallensäuren und mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Hinzu kommen der Abbau von Aminosäuren, Purinen und Wasserstoffperoxiden ebenso wie die Reaktionen der α - und β -Oxidation von Fettsäuren (Titorenko und Rachubinski, 2001).

Genese, Teilung und Vererbung der Peroxisomen werden von mindestens 23 Peroxinen reguliert, die von den *PEX*-Genen des Zellkerns kodiert werden. Mutationen in 11 dieser

Peroxine führen beim Menschen zu letalen peroxisomalen Biogenesestörungen (PBDs; engl. peroxisomal biogenesis disorders) (Wanders *et al.*, 1995; Fujiki, 2000; Gould und Valle, 2000). Diese Störungen unterbinden oder behindern gleichzeitig mehrere peroxisomale Stoffwechselwege, da hier die Biogenese des gesamten Peroxisoms betroffen ist. Im Gegensatz dazu stehen die Störungen, bei denen nur ein einzelnes peroxisomales Enzym und somit nur ein einzelner Stoffwechselweg beeinträchtigt ist (Wanders und Tager, 1998). PBDs werden autosomal-rezessiv vererbt und treten bei etwa 1/50,000 aller Lebendgeburten auf (Sacksteder und Gould, 2000). Obwohl alle an einer PBD leidenden Patienten einen Defekt im peroxisomalen Proteinimport aufweisen, zeigen sie doch ein hohes Maß an Heterogenität im Phänotyp. Grundsätzlich wurden die klinischen Befunde in drei Gruppen zusammengefasst, die in ihrer Gesamtheit als Zellweger-Spektrum bezeichnet werden: das Zellweger-Syndrom (ZS), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und das infantile Refsum-Syndrom (IRS). Hinzu kommt der rhizomele Typ des Chondrodysplasia-punctata-Syndroms (rCDP), der ein eng definiertes Krankheitsbild besitzt und nach Definition nicht unter das Zellweger-Spektrum fällt.

ZS wird durch eine Reihe neuronaler, hepatischer und renaler Defekte charakterisiert: extreme allgemeine Muskelhypotonie, Fehlen der Muskeleigenreflexe, Krampfanfälle, schwere psychomotorische Retardierung sowie Gesichtsanomalien in Folge von Hypo- und Dysplasien sind klinische Befunde des ZS. Die Prognose für Patienten mit ZS ist infaust – das Säuglingsalter wird selten überlebt. Patienten, die an NALD leiden, weisen ähnliche Befunde auf, die jedoch meist etwas schwächer ausgeprägt sind als bei ZS-Fällen. Patienten, die an IRS leiden, erreichen ein Alter von bis zu zehn Jahren. IRS-Patienten haben noch mildere Ausprägungen des Phänotyps und können in Einzelfällen bis über 30 Jahre alt werden. Komplementierungsstudien durch Zellfusion haben mindestens 11 distinkte Komplementationsgruppen identifiziert. Patienten mit rCDP hingegen besitzen nur einige Skelett- und Hautabnormitäten und psychomotorische Retardierung infolge eines nur partiellen Defektes des Imports peroxisomaler Membranproteine, der somit nur einen Teil des peroxisomalen Metabolismus beeinträchtigt (Brul *et al.*, 1988; Santos *et al.*, 1988a; Santos *et al.*, 1988b; Lazarow und Moser, 1995; Moser *et al.*, 1995; Slawewski *et al.*, 1995; Wanders *et al.*, 1995; Matsuzono *et al.*, 1999; Gould und Valle, 2000).

1.1.2 Biogenese von Peroxisomen

Die sehr frühen Studien an Peroxisomen legten den Schluss nahe, dass die Peroxisomen durch Abschnürung vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet werden (De Duve und Baudhuin, 1966). Später wurde ein von Lazarow und Fujiki (1985) postuliertes und als „Wachstum und Teilung“ bezeichnetes Modell, wonach neue Peroxisomen nach dem Import neu synthetisierter peroxisomaler Proteine durch Teilung existierender Peroxisomen entstehen, generell akzeptiert. Heinemann und Just (1992) konnten zeigen, dass neu synthetisierte peroxisomale Proteine vor allem in kleine Präperoxisomen niedriger bis mittlerer Dichte importiert werden und dadurch zu größeren Peroxisomen hoher Dichte reifen. Eine zentrale Rolle beim anschließenden Teilungsprozess scheint Pex11p einzunehmen, das in verschiedenen Organismen die Teilung von Peroxisomen stimuliert, aber selbst weder zur Bildung der Membran noch zum Import peroxisomaler Proteine beiträgt. Dieses Modell wurde lange Zeit durch experimentelle Ergebnisse stets bestätigt (Schrader *et al.*, 1998; Passreiter *et al.*, 1998; Erdmann und Blobel, 1995; Marshall *et al.*, 1995).

In den letzten Jahren gibt es jedoch zunehmend Belege für die ursprüngliche Hypothese von De Duve und Baudhuin, dass aus dem ER oder anderen Endomembranen stammende Vesikel an der Bildung der peroxisomalen Membran beteiligt sind und demnach eine *de novo* Bildung von Peroxisomen möglich sein könnte. Erste Hinweise darauf gaben die Untersuchungen von Götte *et al.* (1998) an $\Delta pex19$ -Zellen von *S. cerevisiae*, in denen keine morphologisch detektierbaren Peroxisomen vorhanden waren. Von großer Bedeutung für die Entwicklung eines Modells jenseits dessen von „Wachstum und Teilung“ war jedoch die Beobachtung, dass die Expression von Pex3p, Pex16p bzw. Pex19p in den jeweiligen $\Delta pex3$ -, $\Delta pex16$ - und $\Delta pex19$ -Zellen zur Neogenese von Peroxisomen führt und somit ein Biogeneseweg ohne zuvor existierende Peroxisomen möglich sein muss (Götte *et al.*, 1998; Kunau, 1998; Matsuzono *et al.*, 1999; South and Gould, 1999). Wie exakt Peroxisomen unter diesen Umständen gebildet werden, ist zwar noch nicht geklärt, doch scheinen einige Resultate wieder auf eine Rolle der ER-Membran hinzudeuten (v.a. Elgersma *et al.*, 1997). Dieser Befund wurde auch an Zellen gemacht, die aus PBD-Patienten gewonnen worden waren und überhaupt keine peroxisomalen Membranen mehr aufwiesen. Komplementationsstudien ergaben, dass dieser Phänotyp nur durch Mutationen in den Genen *PEX3*, *PEX16* oder *PEX19* hervorgerufen wird (Honscho *et al.*, 1998; Shimozawa *et al.*, 1998c; Matsuzono *et al.*, 1999; South und Gould, 1999; South *et al.*, 2000). Eine systematische Analyse der Biogenese der peroxisomalen Membran in allen bekannten Δpex -Mutanten von *S. cerevisiae* ergab, dass nur

PEX3 und *PEX19* für die Synthese der peroxisomalen Membran erforderlich sind – wobei anzumerken ist, dass bisher kein *PEX16* Homolog in *S. cerevisiae* identifiziert werden konnte (Hettema *et al.*, 2000). Mehrere Untersuchungen haben sich mit dem Verbleib der peroxisomalen Membranproteine (PMP) in den $\Delta pex3$ -, $\Delta pex16$ - und $\Delta pex19$ -Zellen verschiedener Organismen beschäftigt. In allen Fällen wurde beobachtet, dass die meisten PMP in diesen Zelltypen in verringerter Menge vorlagen, was in mindestens einem Fall auf eine erhöhte Proteolyse zurückzuführen war (Kinoshita *et al.*, 1998). Andere PMP wurden offenbar ins Mitochondrium fehllokalisiert (Okumoto *et al.*, 1998; South *et al.*, 2000).

Die völlige Abwesenheit peroxisomaler Membranen in Zellen, denen keine fehlerfreie Kopie von *PEX3*, *PEX16* oder *PEX19* zur Verfügung steht, legt nahe, dass diese Peroxine an einem essentiellen Schritt der Synthese der peroxisomalen Membran beteiligt sind. Pex19p ist ein überwiegend cytosolisch und zu einem kleineren Teil an der peroxisomalen Membran lokalisiertes Protein, das *in vivo* farnesyliert wird (Götte *et al.*, 1998). Es bindet mit hoher Affinität an zahlreiche PMP. Diese Bindung erfolgt an diejenigen Bereiche der PMP, die die Informationen für die Zielsteuerung dieser Proteine an die peroxisomale Membran enthalten. Auf eine Rolle als Rezeptormolekül für die Integrationssubstrate in die peroxisomale Membran weist auch eine Untersuchung hin, wonach in der Folge einer Fusion von Pex19p mit einem Kernlokalisierungssignal PMP im Nukleoplasma angereichert werden (Götte *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1999a, b; Sacksteder *et al.*, 2000). Von Pex3p und Pex16p ist zwar bekannt, dass sie mit Pex19p interagieren (Götte *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1999a, b; Sacksteder *et al.*, 2000), doch gibt es bislang keinen direkten Hinweis darauf, ob sie wie Pex19p als Rezeptoren für PMP fungieren.

Es ergab sich aus allen diesen Beobachtungen ein Modell, das zwei sich ergänzende Wege für die Biogenese der peroxisomalen Membran postuliert (Abb. 1.1). Ein Weg basiert dabei auf der auf einer von Pex3p und Pex19p (und in *H. sapiens* auch von Pex16p) vermittelten Bildung peroxisomaler Vesikel, deren Ursprung in einem „präperoxisomalen Kompartiment“, also vermutlich einem anderen Organell wie dem ER, liegen dürfte. Es muss allerdings eingestanden werden, dass die Beweise für ein solches präperoxisomales Kompartiment sehr spärlich sind und seine Existenz noch immer kontrovers diskutiert wird. Der andere Weg geht von bereits existierenden Peroxisomen aus, die durch den Import peroxisomaler Matrixproteine und den Einbau von PMP und Lipiden wachsen. Anschließend würde die Teilung des Organells durch Pex11p auf bisher nicht verstandene Weise induziert.

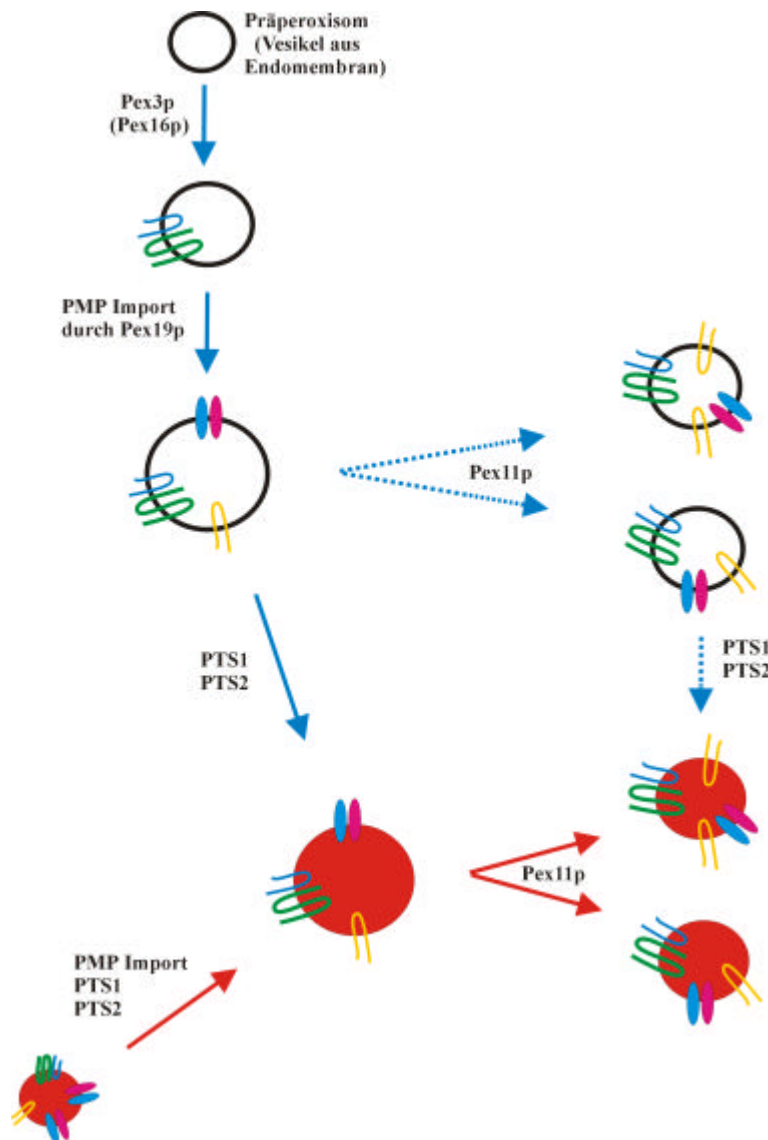


Abb. 1.1: Das Zwei-Wege-Modell der peroxisomalen Biogenese. Bei der Biogenese *de novo* (blau) vermitteln Pex3p (und ggf. Pex16p) die Bildung früher peroxisomaler Vesikel aus anderen Endomembranen der Zelle. Pex19p vermittelt dann den Import weiterer PMP, die u.a. den Import der peroxisomalen Matrixproteine über die PTS1- und PTS2-Importwege ermöglichen. Denkbar ist auch, dass es unter Vermittlung von Pex11p erst zu einer Teilung der Präperoxisomen kommt, bevor die Matrixproteine importiert werden (gestrichelt blau). Im zweiten Weg der Biogenese (rot) wachsen bereits vorhandene Peroxisomen durch fortgesetzten Import von PMP und Matrixproteinen. Nach Erreichen einer kritischen Größe wird dann die Teilung in zwei Tochterorganellen von Pex11p induziert.

Ein solches Zwei-Wege-Modell könnte fast alle aktuellen Beobachtungen zur peroxisomalen Biogenese erklären (Erdmann und Blobel, 1995, Marshall *et al.*, 1995, Götte *et al.*, 1998; Honsho *et al.*, 1998; Kunau, 1998; Shimosawa *et al.*, a, b, c, 1998; Matsuzono *et al.*, 1999; South und Gould, 1999; South *et al.*, 2000). Nicht mit diesem Modell in Übereinstimmung zu bringen sind die Ergebnisse von Titorenko *et al.* (2000) über die Vesikelfusionen an Peroxisomen in *Y. lipolytica*, doch ist bekannt, dass es zwischen dieser Hefe und anderen Organismen in Bezug auf die Biogenese der Peroxisomen weitere deutliche Unterschiede gibt

und dieser Organismus offenbar hier eine Sonderstellung einnimmt (Dodt *et al.*, 1995; Szilard *et al.*, 1995; Eitzen *et al.*, 1997; Titorenko und Rachubinski, 1998a; South und Gould, 1999).

1.1.3 Import peroxisomaler Matrixproteine

Peroxisomen besitzen weder eigene DNS noch die notwendige Maschinerie, um selbst Proteine zu synthetisieren. Dementsprechend werden alle peroxisomalen Proteine von Genen im Zellkern kodiert und an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert. Über den Mechanismus, wie diese Proteine anschließend über die Membran in den Innenraum des Peroxisoms gelangen, ist in den letzten Jahren sehr intensiv gearbeitet worden. Es zeigte sich, dass der Import peroxisomaler Proteine generelle Parallelen zu den Proteinimportwegen anderer Organellen aufweist, sich aber in vielen der molekularen Details von diesen unterscheidet.

Ähnlich wie Proteine, die über die Membran des ER transportiert werden, besitzen auch die peroxisomalen Matrixproteine Signalsequenzen, die von Rezeptoren im Cytosol gebunden werden. Dieser Komplex aus Signalsequenz und Rezeptor bindet dann an den sogenannten Rezeptor-Bindungskomplex (Docking-Komplex) in der Membran des Peroxisoms und das Substrat gelangt anschließend - möglicherweise über einen Kanal - in den Innenraum des Peroxisoms. Die große Mehrheit der peroxisomalen Matrixproteine besitzt als Signalsequenz für den posttranslationalen Import in das Peroxisom die peroxisomale Zielsteuerungssequenz 1 (PTS1). Die PTS1 besteht aus dem Tripeptid SKL (Serin-Lysin-Leucin) am äußersten C-Terminus des Proteins. Artspezifisch sind auch konservative Austauschungen in diesem Motiv bekannt (Gould *et al.*, 1989; Subramani *et al.*, 2000). Pex5p ist das cytosolische Peroxin, das als Rezeptor direkt an die PTS1 bindet (Dodt *et al.*, 1995, Fransen *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995a, b; Schliebs *et al.*, 1999; Gatto *et al.*, 2000a, b).

Die alternative Signalsequenz PTS2 findet sich nur bei wenigen Matrixproteinen und besitzt als Konsensusmotiv (R/K)(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A), das im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist (Swinkels *et al.*, 1991; de Hoop und Ab, 1992; Rehling *et al.*, 1996a, b; Subramani *et al.*, 2000). Pex7p wurde von Rehling *et al.* (1996) als Rezeptormolekül für PTS2 identifiziert, das Pex18p und Pex21p als Korezeptoren benötigt, um an die peroxisomale Membran und damit an den selben Rezeptor-Bindungskomplex zu gelangen, an dem auch Pex5p andockt (Purdue *et al.*, 1998).

Der Rezeptorbindungskomplex in der Membran des Peroxisoms besteht aus den drei Peroxinen Pex13p, Pex14p und Pex17p. Pex13p ist ein integrales PMP mit zwei Transmembrandomänen (TMD) und beiden Termini auf der cytosolischen Seite. Die C-terminale Region besitzt eine SH3-Domäne (*Src* Homologie 3), die direkt an Pex14p und Pex5p bindet, während der N-Terminus von Pex13p für eine direkte oder indirekte Bindung an Pex7p verantwortlich ist. (Erdmann und Blobel, 1996; Elgersma *et al.*, 1996a, b; Albertini *et al.*, 1997; Huhse *et al.*, 1998; Girzalski *et al.*, 1999, Bottger *et al.*, 2000). Für Pex5p scheint festzustehen, dass Pex14p der erste Bindungspartner an der peroxisomalen Membran ist (Otera *et al.*, 2000; Salomons *et al.*, 2000), während für Pex7p sowohl Pex14p wie Pex13p in Frage kommen könnten. Für Pex14p sind Interaktionen mit Pex5p, Pex7p, Pex13p und Pex17p nachgewiesen (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1999), doch ist bis *dato* die Topologie dieses Peroxins nicht unumstritten; in *H. sapiens* und *H. polymorpha* wird es als integrales Membranprotein beschrieben (Will *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 1999), in *S. cerevisiae* hingegen als peripheres Membranprotein (Albertini *et al.*, 1997). Nach Will *et al.* (1999) befindet sich der C-Terminus des humanen Pex14p im Cytosol, nach Shimizu *et al.* (1999) auch der N-Terminus. Über die Funktion von Pex17p ist nur wenig bekannt. Pex17p interagiert mit Pex14p (Huhse *et al.*, 1998) sowie in Abhängigkeit von Pex14p mit Pex5p (Snyder *et al.*, 1999b).

Wie das zu importierende Protein vom Docking-Komplex über die Membran in den Innenraum des Peroxisoms gelangt, ist bis *dato* noch unklar. Wichtig bei allen mechanistischen Betrachtungen ist jedoch die Tatsache, dass das Peroxisom im Gegensatz zu den Erkenntnissen, die bislang an anderen Organellen gewonnen wurden, nicht nur gefaltete Proteine, sondern sogar Oligomere importieren kann (McNew und Goodman, 1994; 1996). Walton *et al.* (1995) berichten, dass selbst Goldpartikel von bis zu 9 nm Durchmesser an Importsubstrate gekoppelt die Membran des Peroxisoms durchqueren können. In beiden Importwegen scheinen auch Chaperone, nämlich Hsp70 und das DnaJ ähnliche Djp1p, in der Substraterkennung oder der Zielsteuerung der Rezeptor-Substrat-Komplexe mitzuwirken (Walton *et al.*, 1994; Hetteema *et al.*, 1998). Ein umfassendes mechanistisches Modell, das alle diese Beobachtungen erklären könnte, fehlt zur Zeit noch. Grundsätzlich wird aber als wahrscheinlich angenommen, dass es eine Art Import-Kaskade gibt, wie aus der erstaunlichen Zahl von Bindepartnern für Pex5p auf der peroxisomalen Membran geschlossen werden kann: neben Pex13p und Pex14p sind dies Pex8p, Pex10p und Pex12p (Chang *et al.*, 1999b; Okumoto *et al.*, 2000; Rehling *et al.*, 2000; Gould, 2001). Interessanterweise ist Pex8p auf der

Matrixseite der peroxisomalen Membran lokalisiert. In $\Delta pex8$ -Zellen wurde gezeigt, dass die Bindung von Pex5p an die Rezeptorbindungsstellen der Membran immer noch funktioniert (Rehling *et al.*, 2000). Weitere Studien scheinen in der Tat darauf hinzudeuten, dass Pex8p für die Entkopplung von Rezeptor und Substrat verantwortlich ist (Titorenko *et al.*, 1998; Smith und Rachubinski, 2001).

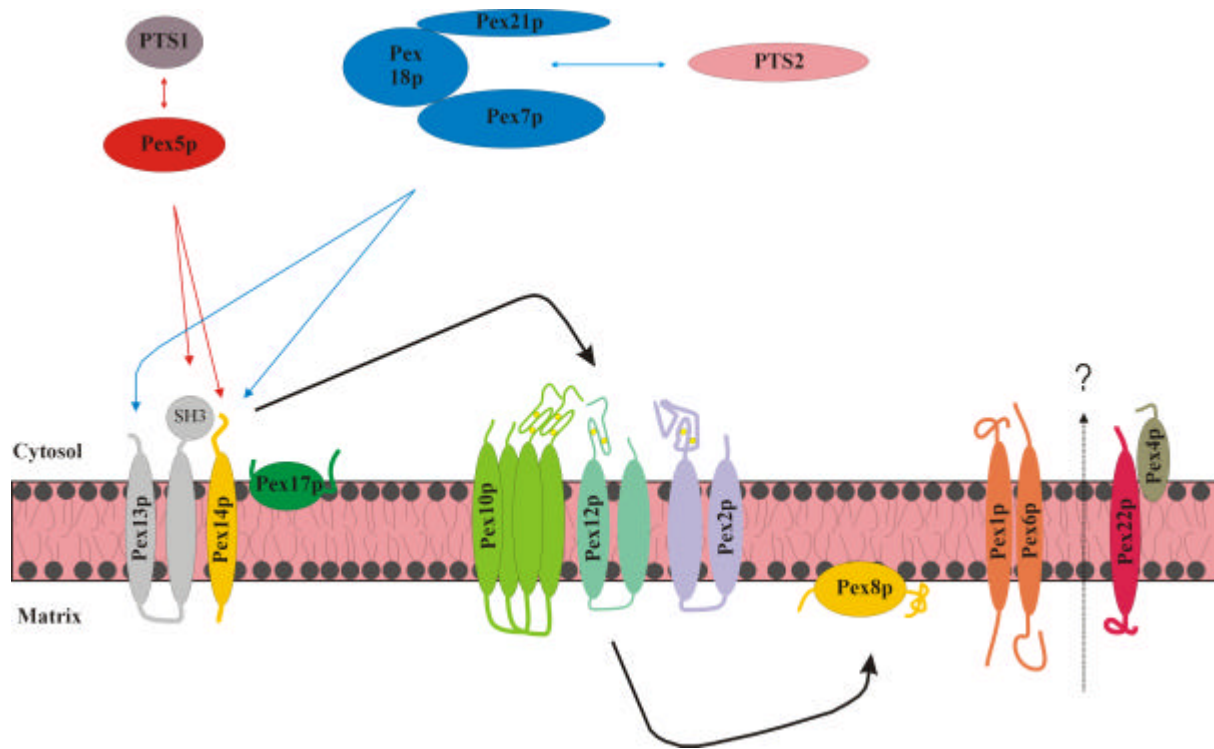
Da Pex5p und Pex7p überwiegend im Cytosol und an der peroxisomalen Membran lokalisiert wurden, wurde postuliert, dass die Rezeptoren ihre Substrate im Cytosol bänden, sie an Rezeptorbindungsstellen und Translokationskomplexe der peroxisomalen Membran heranführten und von ihren Substraten entkoppelt und zurück ins Cytosol entlassen würden, bevor diese über die Membran transloziert würden (Dodt und Gould, 1996). Andere Ergebnisse (van der Klei *et al.*, 1998; Dammai und Subramani, 2001) legen jedoch nahe, dass Pex5p und Pex7p mit ihren Substraten bis in die peroxisomale Matrix gelangen, erst dort entkoppelt werden und anschließend ins Cytosol zurückgeschleust werden. Diese „extended shuttle“ Hypothese leidet allerdings zur Zeit noch daran, dass sich die Beobachtungen über die Aufenthaltsorte sowohl für Pex5p wie für Pex7p je nach Spezies widersprechen (Crookes und Olsen, 1999).

Als Kandidaten für das Ausbilden der eigentlichen Translokationspore werden zuerst die Peroxine Pex2p, Pex10p und Pex12p diskutiert. Sie besitzen alle eine RING-Finger-Domäne und sind integrale PMP. Es wird angenommen, dass sie einen heterotrimeren Komplex bilden, der nach dem Andocken des Rezeptors an den Pex13p-Pex14p-Pex17p-Komplex fungiert (Gould und Valle, 2000; Holroyd und Erdmann, 2001). Tatsächlich konnten Chang *et al.* (1999) und Okumoto *et al.* (2000) zeigen, dass Pex12p und Pex10p über ihre jeweiligen C-terminalen Zink-RING-Domänen interagieren und dass Pex5p an ebendiese RING-Domäne von Pex12p bindet. Auch für eine Funktion nach dem Andocken des Rezeptors an die Membran (Chang *et al.*, 1999b) und für eine direkte Verbindung beider Komplexe durch eine Interaktion von Pex12p mit Pex13p (Albertini *et al.*, 2001) gibt es Belege. Für die bereits seit längerem vermutete Beteiligung von Pex2p an diesem Komplex (Dodt und Gould, 1996; Okumoto *et al.* 2000; Gould und Valle, 2000) gibt es erst seit neuestem einen direkten Beweis (Reguenga *et al.*, 2001).

Weitere vermutete Komponenten der Importmaschinerie, denen noch keine Funktionen zugeordnet werden konnten, sind Pex4p und Pex22p sowie Pex1p und Pex6p. Pex4p ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Ubc10p oder E2) (Wiebel und Kunau, 1992; Crane *et al.*,

1994). Eine Deletion von *PEX4* resultiert in einem Defekt des PTS1-Importweges und kann durch Überexpression von Pex5p kompensiert werden (van der Klei *et al.*, 1998). Möglicherweise spielt Pex4p eine Rolle in der Entkopplung von Pex5p vom Substrat und in der Aktivierung oder Rückführung von Pex5p für den nächsten Transportzyklus. Koller *et al.* (1999a) beschrieben in *P. pastoris* eine Interaktion mit dem peroxisomalen Transmembranprotein Pex22p und zeigten, dass dieses Protein höchstwahrscheinlich für die Rekrutierung von Pex4p an die peroxisomale Membran erforderlich ist. Collins *et al.* (2000) studierten $\Delta pex1$ -, $\Delta pex4$ -, $\Delta pex6$ - und $\Delta pex22$ -Zellen und bestätigten eine späte Rolle von Pex4p und Pex22p in der Translokation (nachdem das Substrat bereits das Lumen des Peroxisoms erreicht hat). Weiterhin postulierten sie für Pex1p und Pex6p eine Rolle vor den von Pex22p und Pex4p beeinflussten Ereignissen. Pex1p und Pex6p sind beide ATPasen der AAA-Familie (Erdmann *et al.*, 1991). Mitglieder dieser Familie können an oligomere Proteinkomplexe binden und die Interaktionen unter ATP-Verbrauch modifizieren oder sogar auflösen (Patel und Latterich, 1998). Holroyd und Erdmann (2001) halten für denkbar, dass Pex1p und Pex6p die Abtrennung der Rezeptoren von der Translokationsmaschinerie bewerkstelligen und diese an den Pex22p-Pex4p-Komplex weiterleiten könnten, wo ihre Rückführung oder Rückgewinnung stattfinden würde. Die Autoren sehen jedoch auch den Widerspruch zu den Ergebnissen von Titorenko und Rachubinski (1998, 2001), die eine Rolle in der frühen Peroxisomenfusion in *Y. lipolytica* postulieren. Mit allen Vorbehalten insbesondere bezüglich der Rollen von Pex1p, Pex2p und Pex6p ergibt sich das in Abb. 1.2 dargestellte Modell des Imports peroxisomaler Matrixproteine.

Abb. 1.2: Modell für den Import peroxisomaler Matrixproteine. Pex5p erkennt PTS1-Proteine im Cytosol als Substrat und bindet in diesem beladenen Zustand an die SH3-Domäne von Pex13p und an Pex14p (rote Linien). PTS2-Proteine werden von Pex7p, Pex18p und Pex21p gebunden und zur peroxisomalen Membran geführt. Pex7p bindet dabei an den N-Terminus von Pex13p und an Pex14p (blaue Linien). Von dort werden die Rezeptor-Substrat-Komplexe an einen heterooligomeren Komplex aus Pex10p und Pex12p abgegeben, der möglicherweise auch Pex2p enthält. Auf der Matrixseite der Membran interagieren die Rezeptorproteine mit Pex8p, bevor sie ins Cytosol zurückgeführt werden. Dabei spielen Pex1p, Pex6p sowie der Komplex aus Pex22p und Pex4p eine Rolle, die noch ungeklärt ist. Nähere Erläuterungen im Text.



1.2 Die Split-Ubiquitin-Methode

Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Split-Ubiquitin-Methode eingesetzt wurde, sollen die Grundmerkmale dieser Technik hier kurz erläutert werden.



Abb. 1.3: Strukturmodell des Ubiquitin-Moleküls (Modelliert nach Daten aus Vijay-Kumar *et al.*, 1987a, b) Der Bereich des Proteins, der Nub umfasst, ist gelb dargestellt, der Bereich, der Cub umfasst, rot. Der Pfeil deutet auf die Stelle im Ubiquitin, an der das Protein in die beiden Subdomänen unterteilt wurde.

Die Split-Ubiquitin-Methode (Johnsson und Varshavsky, 1994a) basiert auf einigen besonderen Eigenschaften des Moleküls Ubiquitin (Ub), das eine wichtige Rolle im gerichteten Proteinabbau spielt (Mayer, 2000; Varshavsky *et al.*, 2000). Das Molekül besteht aus 76 Aminosäuren, deren Sequenz über Artgrenzen hinweg hoch konserviert ist und die eine sehr kompakte Struktur einnehmen. Ub besteht aus einer einzigen Domäne, die sich aus einem viersträngigen β -Faltblatt und einer amphiphilen α -Helix zusammensetzt (Vijay-Kumar *et al.*, 1987a, b; Abb. 1.3). Im Genom von *S. cerevisiae* wird Ub von vier Genen kodiert (*UBI1*, *UBI2*, *UBI3* und *UBI4*); einem Polyubiquitin-Gen (*UBI4*) und drei Genen, die 3' mit den kodierenden Sequenzen für kleine ribosomale Untereinheiten gekoppelt sind. Somit werden alle Ub-Moleküle als Fusionsproteine exprimiert (Özkaynak *et al.*, 1987). Die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Ubps) erkennen das korrekt gefaltete Ubiquitin als Substrat und schneiden es exakt hinter seiner C-terminalen Aminosäure vom Fusionsprotein ab (Tobias und Varshavsky, 1991; Baker *et al.*, 1992). Nicht korrekt faltende Mutanten von Ub werden von den Ubps jedoch nicht oder nur sehr viel schlechter als Substrat erkannt und die entsprechenden Fusionen nicht durch die Ubps prozessiert (Johnsson und Varshavsky, 1994a).

Werden der N-terminale Teil des Ub (Nub) und der C-terminale Teil des Ub (Cub) als zwei etwa gleich große Teile getrennt voneinander in einer Zelle exprimiert (Abb. 1.3), so können die beiden Teile zur vollständigen Ub-Domäne reassoziieren (Johnsson und Varshavsky, 1994a). Ist an den C-Terminus des Ubiquitins ein Reporterprotein fusioniert, so können die Ubps erst nach Reassoziierung der beiden Ub-Hälften dieses Reporterprotein abspalten. Geschnittenes Reporterprotein und ungeschnittenes Fusionsprotein lassen sich quantitativ auf einem Western Blot nachweisen. Die Reassoziierung des Ub aus den beiden Teilen ist eine bimolekulare Reaktion und damit in hohem Maße von der lokalen Konzentration beider Untereinheiten abhängig. Die Kinetik der Spaltungsreaktion ist somit ein Maß für die lokale Konzentration der beiden Hälften. Werden Nub und Cub an Proteine fusioniert, die in der Zelle miteinander interagieren, so erhöht die Interaktion der beiden Testproteine die lokale Konzentration der Ub-Untereinheiten. Dies führt zu einer Erhöhung der Reassoziationsrate der beiden Ub-Peptide und damit zu einer effizienten Abspaltung des Reporterpeptides durch die Ubps (Abb. 1.4; Johnsson und Varshavsky, 1994a, b).

Da die Reassoziierung von ungekoppelten Nub und Cub bereits mit recht hoher Effizienz verlaufen kann, wurde die Anwendbarkeit des Verfahrens dadurch erweitert, dass gezielt Mu-

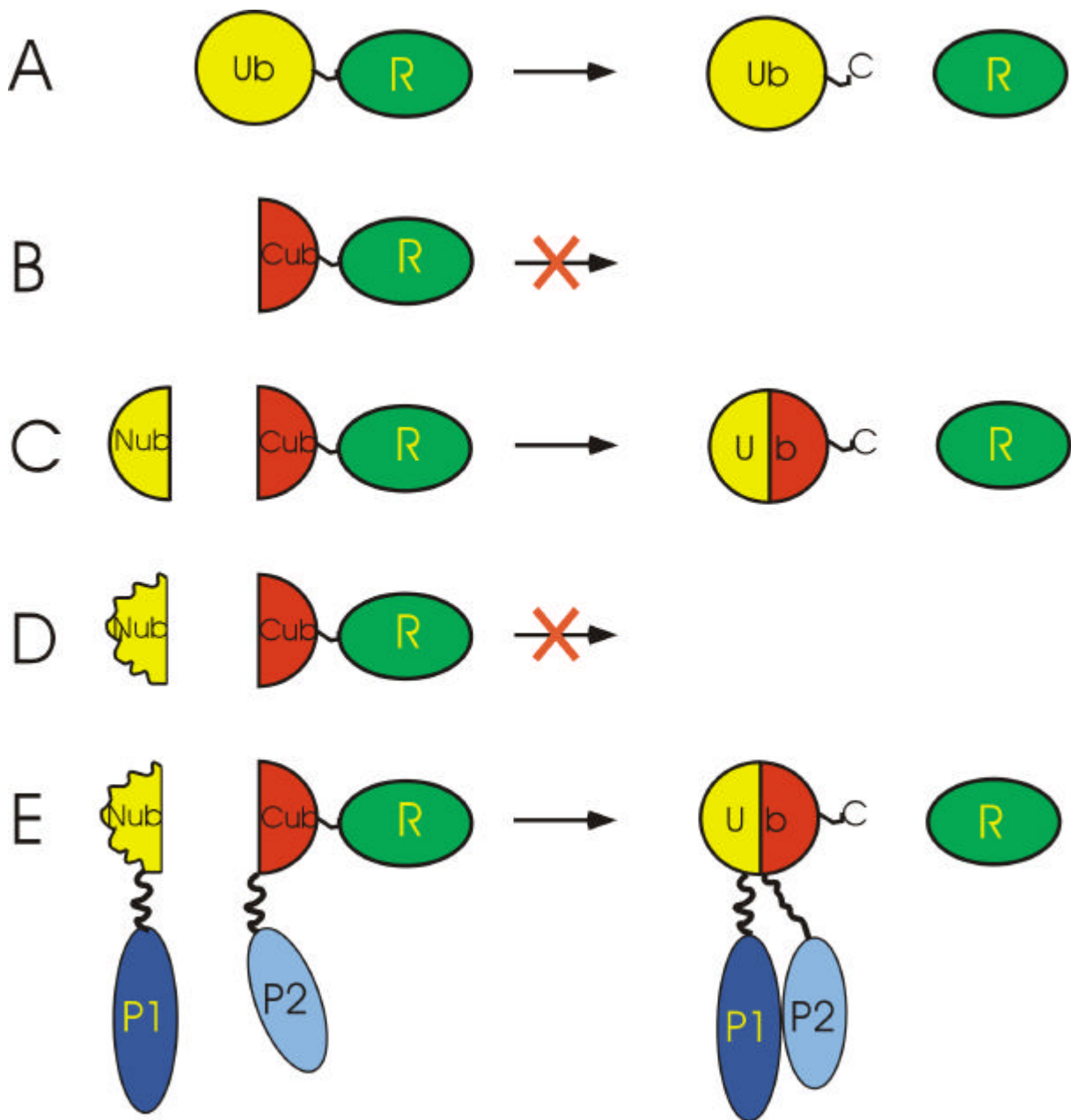


Abb. 1.4: Das Split-Ubiquitin-System zur Messung von Proteininteraktionen in der lebenden Zelle.

(A) Ein Reporterprotein (R), das an den C-Terminus des Ubiquitins (Ub) gekoppelt wurde, wird unmittelbar nach seiner Synthese von den cytoplasmatischen Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Ubps) abgespalten. (B) Wird nur die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (Aminosäuren 36-76, Cub) mit dem fusionierten Reporterprotein exprimiert, so wird Cub alleine nicht von den Ubps erkannt und das Fusionsprotein nicht gespalten, das Reporterprotein folglich nicht freigesetzt. (C) Werden in einer Zelle die N-terminale Hälfte des Ubiquitins (Aminosäuren 1-35, Nub) und die Cub-Reporterproteinfusion koexprimiert, so reassoziieren Nub und Cub zum vollständigen Ub-Molekül. Dieses wird von den Ubps erkannt und der Reporter abgetrennt. (D) Setzt man hingegen Mutationen von Nub mit reduzierter Affinität zu Cub ein, so wird das Reporterprotein trotz Koexpression nicht oder nur sehr langsam vom Cub abgespalten. (E) Nub oder eine seiner Mutanten wird an ein Protein P1 gekoppelt, das mit dem Protein P2 in der Zelle einen Komplex bildet. Das Cub-Reporterkonstrukt ist C-terminal an P2 gekoppelt. Durch die Bildung des Komplexes zwischen P1 und P2 werden Nub und Cub zusammengeführt, so dass selbst bei den Mutanten von Nub eine effiziente Abspaltung des Reporters induziert wird.

tationen in die Sequenz des Nub eingeführt wurden. Der Austausch des Isoleucin 13 des Nub gegen Alanin (NuA) bzw. Glycin (NuG) führte zu einer verminderten Bindungsstärke dieser Nub-Versionen an das Cub, wodurch sich der Effekt von Proteininteraktionen auf die Nub-Cub-Reassoziaton deutlicher nachweisen ließ (Johnsson und Varshavsky, 1994a). Inzwischen erlauben 16 verschiedenen Versionen von Nub, die Sensitivität der Reassoziationsreaktionen sehr fein auf die jeweilige Fragestellung abzustimmen (Eckert, 1997; Raquet *et al.*, 2001).

Der Einsatz des Split-Ub-Systems ist für eine Reihe von Anwendungen beschrieben worden, nämlich die Messung von Interaktionen zwischen löslichen Proteinen (Johnsson und Varshavsky, 1994a), von transienten Interaktionen zwischen Translokationssubstraten und Komponenten des Translokationsapparates des Endoplasmatischen Retikulums (Johnsson und Varshavsky, 1994b; Dünwald *et al.*, 1999), von Interaktionen von Membranproteinen (Stagljar *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 2000). sowie von Proteinfaltungszuständen *in vivo* (Raquet *et al.*, 2001; Dues *et al.*, 2001). Laser *et al.* (2000) und Gromöller *et al.* (2000) haben darüber hinaus das Split-Ub-System erfolgreich zur Suche nach neuen Interaktionspartnern („Screening“) eingesetzt. Die verschiedenen Anwendungen der Methode sind in einem Übersichtsartikel (Eckert *et al.*, 2001) beschrieben. In dieser Arbeit wird RUra3p als Reporterprotein verwendet. Ura3p katalysiert den letzten Schritt der Biosynthese von Uracil. Der Sequenz von Ura3p ist ein Argininrest (R) vorgesetzt, der nach der „N-end-rule“ den raschen Abbau des Reporterproteins induziert. Hierdurch entsteht ein selektierbarer Phänotyp: Zellen, in denen Nub und Cub nicht interagieren, sind Uracil-prototroph, während Zellen, in denen Nub und Cub interagieren, Uracil-auxotroph sind (Wittke *et al.*, 1999; Varshavsky *et al.*, 2000).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte begonnen werden, das Netzwerk der Interaktionen zwischen den Oberflächenproteinen des Peroxisoms zu erstellen. Damit sollte die systematische Kartierung aller Proteine der Hefe, die mit der Two-Hybrid-Methode begonnen, aber nicht auf die membranassoziierten Proteine übertragen werden konnte, weitergeführt werden (Ito *et al.*, 2001). Außerdem sollten die Möglichkeiten zum Einsatz des Split-Ub-Systems für eine Suche nach Interaktionspartnern („Screening“) von Membranproteinen in einem Experiment ausgelotet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in analysenreiner Qualität von den Firmen C. Roth (Karlsruhe), E. Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Nährmedien für die Hefe- und Bakterienkultivierung stammten von Difco (Augsburg).

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, DNS-modifizierenden Enzyme und Polymerasen wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), New England Biolabs (Bad Schwallbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und Gibco-BRL (Eggenstein) bezogen. Lieferant für Lysozym war Biomol (Hamburg), für RNase A Sigma (Deisenhofen).

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser von Milli-Q[®]-Qualität oder zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

2.1.2 Antikörper

Zum Nachweis und zur Präzipitation von Proteinen, die mit dem *ha*- oder dem *c-myc*-Epitop markiert waren, wurden anti-*ha*-Antikörper und anti-*myc*-Antikörper aus der Maus *mus musculus* verwendet (beide Hiss Diagnostics, Freiburg i. Br.). Zum Nachweis dieser Antikörper in der Immunodetektion diente ein gegen die Fc-Region von Antikörpern der Maus gerichteter Antikörper aus der Ziege *Capra aegagrus f. hircus* (Ziege-anti-Maus IgG), an den die Peroxidase aus dem Meerrettich *Armoracia rusticana* gekoppelt ist (BioRad, Hercules, USA). Zur Präzipitation der Erstantikörper wurde Protein A-Agarose (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet.

2.1.3 Antibiotika

Den flüssigen und festen LB- und YT-Medien (2.X.X) wurde Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 mg/l oder Chloramphenicol zu einer Endkonzentration von 80 mg/l zugesetzt. Zur Selektion von Hefen wurde Geneticin (G418) in YPD-Medien (2.X.X) in einer Konzentration von 200 mg/l verwendet.

2.1.4 Molekulargewichtsstandard für Proteine

Um die Molekulargewichte der immunologisch nachgewiesenen Proteine im Western Blot abschätzen zu können, wurde mit den Proben zusammen ein Molekulargewichtsstandard (Pharmacia Biotech, Freiburg) in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Ponceau-S-Färbung (2.2.2.4) sichtbar gemacht. Dieser Standard setzt sich wie folgt zusammen:

Phosphorylase b	94 kDa
Albumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboxyanhydrase	30 kDa
Trypsin-Inhibitor	20 kDa
α -Lactalbumin	14 kDa

2.1.5 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Deletion der angegebenen Gene sowie zur Kontrolle der erfolgreichen Integration der Kanamycinresistenz- bzw. Leucin2-Kassetten verwendet. Unterstrichen sind die Homologien zu den auszuschaltenden Genen und deren benachbarten Regionen, soweit die Herstellung der entsprechend flankierten Kanamycin-Kassette durch PCR auf dem Plasmid pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) erfolgte.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz des Oligonukleotids (5' - 3')</u>
Pex2-1	GGA ACG GAT GCG ATT TCC CCT CC
Pex2-2	GGA TCC CTG CTG CTG TGG TTG A
Pex2-3	CCA TCC CGA ATC AAC CTT GTG G
Pex3-K/O-Neu-Vw	<u>GAG CAT GGG GTA TAT TAT TGA GGT AGT TAA TAC TAC CAG</u> CTG AAG CTT CGT ACG
Pex3-K/O-Neu-Rv	<u>GAC TCT AAC ACT ATG GAT GTT GCT GTG CTT TCG ATA CAT</u> <u>TAG GCC ACT AGT GGA TCT G</u>
Pex3-Kontrolle 1	GTT CCC GTC TGC CAT TTC GAT G
Pex3-Kontrolle 2	CGA GTC TTC CTG TGT CTG CTC G
Pex3-KanaFw-Kontr.	GTC ACC ATA TCT GCG CTA CG
Pex4-K/O-Vw	CGC GTT ACC CGT ATC ATC ATG
Pex4-K/O-Rv	CCT CAA CGA TCT ACT GGG CTG CC
Pex5-K/O-Vw	CGA TTG GTC TTG CCA TCC GTC C
Pex5-K/O-Rv	CTC CCT GAT AAA CCT CCT TTG GCC
Pex10-KO-Vw	<u>CAC TAC TAC ATC GGT GGG GGG TCA TAC AAT AGA GGA CCA</u> <u>AAG CCA GCT GAA GCT TCG TAC G</u>
Pex10-KO-Rv	<u>CCT GTG GAC AAT GCT AAA AGA GTA GTC AAA TTA TTG ATT</u> <u>AGT TCC TGG CCA CTA GTG GAT CTG</u>
Pex10-1	CTT CTT GCA AGT AAT CAG CCG G
Pex10-3	GCC CTC TTC TCT AAA ATT GGC C

Pex10-2	CCA CAT TGG TGT ATA GTT GG
Pex10-4	GTA CGA AAC AAT GGG CTG GC
Pex10-5	GCT GAT CCT AAG CAG TGG GG
Pex11-KO-Vw	CGG AGA ACC CGA AGC GAT GGG TA
Pex11-KO-Rv	GGT ATG GAC ATG GAA CAT TGG GTC
Pex11-Kontrolle 1	GTC ACC ACC CAC AAT TGC AAG G
Pex11-Kontrolle 2	CGA CGT TGT CGC TGG CCA AC
Pex12-1	GTG TGG AGT CAT CCT TTC GTC TC
Pex12-2	GCC TTT CTC TTC CAC GCA AGA TG
Pex12-3	CCA ACT TCG CTG TGA TAT AGG GG
Pex13-KO-Vw	<u>CTA TCT ATA AAT ATC AAG GGG ATT CTA TAC TAT AAC AAT</u> <u>ACC TGC GGC CAG CTG AAG CTT CGT ACG</u>
Pex13-KO-Rv	<u>GAT TTT ACT ATA TAT ATA TGC GAA TAT ATG TGT GCA AAT</u> <u>ATT GAT GCA GGC CAC TAG TGG ATC TG</u>
Pex13-1	GAC ACC TTT TAG TCG CCC GGT TT
Pex13-2	GGA GAT TGT GTT TTC AAG ATG G
Pex13-3	CCA TAT CCC GCT CCT GCA CCG
Pex13-4	CTG AAC TTC AAA GGG CTT G
Pex13-5	CTG GGG GTG CTG GTA AGA AG
Pex14-Del-Vw	<u>CAA TTT GAA AAC TCA AGT AAA ACA GAG AAG TTG TAA GGT</u> <u>GAA TAA GGA GCC AGC TGA AGC TTC GTA CG</u>
Pex14-Del-Rv	<u>CCG TTA AAA AAC TAA TTA CTT ACA TAG AAT TGC GCT ATG</u> <u>GGG GCC ACT AGT GGA TCT G</u>
Pex14-Kontrolle-1	CGA ATA TAC CTG CCC ATG GTC
Pex14-Kontrolle-2	CCT GTG AGG CTC TAT TCT CAG
Pex15-KO-Vw	<u>GCT GCA AGT GAG ATA ATG AAC AAT CTG GCC AGC TGA AGC</u> <u>TTC GTA CG</u>
Pex15-KO-Rv	<u>TAT ACT CGC TAG AAG TTT TAG CAA CCC GAC CGG CAG ATC</u> <u>CGC GGC CGC</u>
Pex15-1	GAG CGG CTT ATC GCC GTC GG
Pex15-2	GGC CAG GGG TAA GAG GTG TGT G
Pex15-3	CAT TGA GGG GTA TCT AAC GTG
15-Leu-1	GGA GGC TTC CAG CGC CTC ATC
Pex15-Del.-kontr.-Up	CGC CGT CGG AGT GAC ATC
Pex15-Del.-kontr.-Dw	CGG GGC GCC GTT CCA GTA CTC
Pex17-KO-Vw	GGG CTC GGT ATT ATT GTT ACA CCC
Pex17-KO-Rv	CGG ATG CGT TAC GTG CAC TAG AGC G
Pex17-Kontrolle 1	GCG CCA TCT ACA CAC CAG ATC
Pex17-Kontrolle 2	CCC CAA CGA CGA TAC TGG GG
Pex19-Del-Vw	<u>GAA AGA ATT ACA AAT TGT GGG AAC CGA AGT ATT GAC GGA</u> <u>AAG AAG AAG CCA GCT GAA GCT TCG TAC G</u>
Pex19-Del-Rv	<u>CTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TAC TGT TAT CAT AAA TAT</u> <u>ATA TAC CGG CCA CTA GTG GAT CTG</u>
Pex19-Kontrolle-1	CCG CTG GAT GAA ATT GTG TAT G
Pex19-Kontrolle-2	GCT GCT CAT GGT ACC GTG AC
Pex22-K/O-Vw	GAA TAA TCT CCT TCG CAA TAC CAG CG
Pex22-K/O-Rw	GGA TGA CTT GCC CAA GAC AAG ATC CG

Tab. 2.1: Liste der zur Deletion von PEX-Genen und zur Deletionskontrolle eingesetzten Oligonukleotide. Unterstrichen sind Homologien zu genomischen Sequenzen oder Sequenzen auf pUG6 (siehe Text).

Zur Fusion der 9-myc kodierenden Sequenz an verschiedene PEX-Gene wurden die folgenden Oligonukleotide auf Plasmid-DNS von pYM6 (Knop *et al.*, 1999) verwendet. Unterstrichen sind die zur genomischen DNS homologen Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz des Oligonukleotids (5' - 3')
Pex4-Vw-MYC	<u>GGA TTG TAA AGT ACT TCC TAG CAG AAA GAG AGC GGA TCA ACA ACC ATC</u> GTA CGC TGC AGG TCG AC
Pex4-Rv-MYC	<u>GAA AAA GTG TTT GAA AAA AGC TCC TCA ACG ATC TAC TGG GCT GCC ATC</u> GAT GAA TTC GAG CTC G
Pex10-Vw-MYC	<u>GTG CAG ACA ACA CTG TCA ACC ACA GGA AAT TCT GGT CCT GCG GCA ACG TAC</u> GCT GCA GGT CGA C
Pex10-Rv-MYC	<u>CCC CTT CGC GTT TTA CTT CTC CTG CTC AGA GCT CTG CGT TAT TTC ATC GAT</u> GAA TTC GAG CTC G
Pex11-Vw-MYC	<u>GGT GTT GTC ACA TCT ATC CTT GGT ATG CAA GAC ATG TGG AAA GCT ACA CGT</u> ACG CTG CAG GTC GAC
Pex11-Rw-MYC	<u>GGT CGT CAG GTA TCA CGA GCG GGT AAC AGA ACT AAG CAG TTA TAG CGA TCG</u> ATG AAT TCG AGC TCG
Pex12-Vw-MYC	<u>AAC ACA CGA ATA AAT GGG AAG TTG TGA CAG GTA TTA GGA AGC TAC TAA</u> <u>TCC GTA CGC TGC AGG TCG AC</u>
Pex12-Rv-MYC	<u>GAT GCC ACT GAC AAG CCT TTC TCT TCC ACG CAA GAT GTA ATA CTT CGA TCG</u> ATG AAT TCG AGC TCG
Pex22-Vw-MYC	<u>GTT GAT AGC GAT GTA GAG GAT GTG CTG ATT GAC ACT TTA TGC AAT CGT ACG</u> CTG CAG GTC GAC
Pex22-Rv-MYC	<u>CTA GGC GAC GTT TCT ACA TTG TCA AAC CCT GGC ATT GTT AGA CAT CAT CGA</u> TGA ATT CGA GCT CG

Tab. 2.2: Liste der Oligonukleotide zur Herstellung von genomischen PEX-9-MYC-Fusionen. Unterstrichen sind die zur genomischen DNS homologen Sequenzen.

Zum Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombinationsereignisse von PCR-Produkten oder Plasmid-DNS ins Hefegenom (2.2.7) sowie zur Sequenzierung klonierter Vektoren wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Sequenz des Oligonukleotids (5' - 3')
Cub	CTG CTT ACC GGC GAT CAA TCT
CuP-Terminal	CTT CTT GTT AGT GCA ATA TCA TAT AG
Kan-Rev-Neu	CCC TGC TCG CAG GTC TGC AGC GAG
Kan-Vw	CCT CGA CAT CAT CTG CCC
Nub	GAT ACC ATC GAC AAC GTT AAG TCG
Pex1K3	GTC CGG AAT ATC TCT CCG ACT ATT
Pex1K4	TAG GGT CAT GTC ACG TAA TAA GCA
PEX5K1	CTT TAG AAC GAC CAG ACT GTT
Pex5K3	TCC GAC AAG TCG GTA CCC TCT TC
Pex6K1 (Pex1)	ACC ATC TGT GAT CCT CGC AGA
Pex6K2 (Pex1)	TGG ATG GTG CCG AGG GCC TTG
T3-Primer	GAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AAC
T7-Primer	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CG

Tab. 2.3 : Liste der Oligonukleotide zur Integrations- und Sequenzkontrolle.

2.1.6 Kulturmedien

Alle Kulturmedien wurden für 20 min bei 121°C und 1960 hPa autoklaviert.

LB-Flüssigmedium:

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; in wässriger Lösung mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

LB-Festmedium (LB-Platten):

LB-Medium wie oben mit 15 g/l Agar Agar

2×YT-Flüssigmedium:

8 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5g/l NaCl; in wässriger Lösung

2×YT-Festmedium (2×YT-Platten):

2×YT-Medium wie oben mit 15 g/l Agar Agar.

YPD-Flüssigmedium:

10 g/l Bacto-Hefeextrakt; 20 g/l Bacto-Pepton; 2% (M/V) Glukose; 40 mg/l Adenin-Hemisulfat; in wässriger Lösung.

YPD-Festmedium (YPD-Platten):

YPD-Medium wie oben mit 20 g/l Agar Agar.

SD-Flüssigmedium:

6,7 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren; 1% (M/V) 100× Aminosäurelösung (6 g/l L-Isoleucin, 2 g/l L-Arginin-HCl, 4 g/l L-Lysin-HCl, 6 g/l L-Phenylalanin, 1 g/l L-Threonin und, falls keine spezifische Methionin-Konzentration erforderlich war, 1 g/l L-Methionin); 2‰ Adeninlösung (1% (M/M) Adenin-Hemisulfat in 0,1M NaOH); 2% (M/M) Glukose oder Galaktose. Je nach Bedarf wurden die Medien mit 1% (V/V) 100× L-Tryptophanlösung (4 g/l), 1% (V/V) 100× L-Leucinlösung (6 g/l), 100× Histidin-Monohydratlösung (2 g/l) und 4‰ Uracillösung (1% (M/M) in 0,1M NaOH) ergänzt. Soweit spezifische Konzentrationen von L-Methionin erforderlich waren, wurden diese durch Zugabe entsprechender Mengen von 50mM L-Methioninlösung erreicht.

SD-Festmedium (SD-Platten):

SD-Flüssigmedium wie oben mit 20 g/l Agar Agar.

FOA-Festmedium (FOA-Platten):

6,7 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren; 1 g/l FOA; 1% (M/V) 100× Aminosäurelösung (6 g/l L-Isoleucin, 2 g/l L-Arginin-HCl, 4 g/l L-Lysin-HCl, 6 g/l L-Phenylalanin, 1 g/l L-Threonin und, falls keine spezifische Methionin-Konzentration erforderlich war, 1 g/l L-Methionin); 2‰ Adeninlösung (1% (M/M) Adenin-Hemisulfat in 0,1M NaOH); 2,5 % (V/V) Uracillösung (2 g/l); 2% (M/M) Glukose oder Galaktose und 20 g/l Agar Agar. Je nach Bedarf wurden die Medien mit 1% (V/V) 100× L-Tryptophanlösung (4 g/l), 1% (V/V) 100× L-Leucinlösung (6 g/l) und 100× Histidin-Monohydratlösung (2 g/l) ergänzt. Soweit spezifische Konzentrationen von L-Methionin erforderlich waren, wurden diese durch Zugabe entsprechender Mengen von 50mM L-Methioninlösung erreicht.

Vorbereitungsmedium für Wachstum auf Ölsäure (3‰-Glukose-Platten):

6,7 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren; 1% (M/V) 100× Aminosäurelösung (6 g/l L-Isoleucin, 2 g/l L-Arginin-HCl, 4 g/l L-Lysin-HCl, 6 g/l L-Phenylalanin, 1 g/l L-Threonin und, falls keine spezifische Methionin-Konzentration erforderlich war, 1 g/l L-Methionin); 2‰ Adeninlösung (1% (M/M) Adenin-Hemisulfat in 0,1M NaOH); 3‰ (M/M) Glukose und 20 g/l Agar Agar. Je nach Bedarf wurden die Medien mit 1% (V/V) 100× L-Tryptophanlösung (4 g/l), 1% (V/V) 100× L-Leucinlösung (6 g/l), 100× Histidin-Monohydratlösung (2 g/l) und 2‰ Uracillösung (1% (M/M) in 0,1M NaOH) ergänzt.

Ölsäure-Festmedium:

1,26‰ Ölsäure; 5‰ Tween[®] 40; 2‰ Adeninlösung (1% (M/M) Adenin-Hemisulfat in 0,1M NaOH) und 20 g/l Agar Agar wurden auf 85% des Endvolumens mit Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 6,7 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren, 4 % (V/V) Aminosäuremix für Ölsäureplatten (0,8 g/l Adenin; 0,8 g/l Arginin; 0,75 g/l Tyrosin; 0,75 g/l Isoleucin; 1,2 g/l Lysin; 1,25 g/l Phenylalanin; 2,5 g/l Glutaminsäure; 2,5 g/l Aspartat; 3,75 g/l Valin; 5 g/l Threonin; 10 g/l Serin) und je nach Bedarf 1% (V/V) 100× L-Tryptophanlösung (4 g/l), 1% (V/V) 100× L-Leucinlösung (6 g/l), 100× Histidin-Monohydratlösung (2 g/l) und 2‰ Uracillösung (1% (M/M) in 0,1M NaOH) zugesetzt. Das Medium wurde lauwarm und sehr dünn gegossen.

Two-Hybrid-Festmedium:

6,7 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren; 1% (M/V) 100× Aminosäurelösung (6 g/l L-Isoleucin, 2 g/l L-Arginin-HCl, 4 g/l L-Lysin-HCl, 6 g/l L-Phenylalanin, 1 g/l L-Threonin und 1 g/l L-Methionin); 2‰ Adeninlösung (1% (M/M) Adenin-Hemisulfat in 0,1M NaOH); 2% (M/M) Glukose; 4% Uracillösung (1% (M/M) in 0,1M NaOH) wurden mit 20 g/l Agar Agar erhitzt und nach dem Abkühlen bei etwa 55°C mit dem Histidin-Antimetabolit 3'-Aminotriazol zu Endkonzentrationen von 0, 5, 10, 25, 50 µM versetzt.

2.1.7 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme eingesetzt:

- *E. coli* XL1Blue (Stratagene, Heidelberg). Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZDM15Tn10(tet^r)].
- *E. coli* DH5αF' (Woodcock *et al.*, 1989; Raleigh *et al.*, 1989). Genotyp: F'/endA1, hsdR17(rk⁻mk⁺) supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal^r), relA1, deoR, ΔlacIZYA-argF)_{U169} (Φ80dlacΔ(lacZ)M15).

2.1.8 Hefestämme

Name	Genotyp	Ausgangsstamm	Quelle
JD52	Mata ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63	-	Dohmen <i>et al.</i> , 1995
JD53	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63	-	Dohmen <i>et al.</i> , 1995
JD55	Mata ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 UBR1::HIS3	-	Dohmen <i>et al.</i> , 1995
JD53-Δpex2	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX2::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex3	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 Δpex3	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex4	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX4::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex5	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX5::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex10	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX10::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex11	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX11::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex12	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX12::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex13	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX13::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53-Δpex14	Matα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 PEX14::KAN ^r	JD53	diese Arbeit

JD53- Δ pex15	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 PEX15::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53- Δ pex17	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 PEX17::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53- Δ pex19	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 PEX19::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53- Δ pex22	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 PEX22::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53- Δ pex3/11	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 Δ pex3 PEX11::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
JD53- Δ pex3/19	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 Δ pex3 PEX19::KAN ^r	JD53	diese Arbeit
NUI-PEX1-JD53	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 PEX1::CUP-NUI-PEX1 TRP1	JD53	diese Arbeit
NUI-PEX5-JD53	Mat α ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ 200 lys2-801 trp1 Δ 63 PEX5::CUP-NUI-PEX1 TRP1	JD53	diese Arbeit
BY4741	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	---	EUROSCARF
Y00352 (Δ pex22)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YAL055w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y00601 (Δ pex12)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR026c::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y01214 (Δ pex2)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YJL210w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y01735 (Δ pex15)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOL044w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y01998 (Δ pex17)	BY4741; Mat a; his3(1; leu2(0; met15(0; ura3 Δ 0; YNL214w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y03603 (Δ pex5)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR244w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y03624 (Δ pex10)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR265w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y03688 (Δ pex3)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR329c::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y03762 (Δ pex19)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDL065c::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y04140 (Δ pex13)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR191w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y04520 (Δ pex14)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGL153w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y04763 (Δ pex4)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGR133w::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y07192 (Δ pex11)	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOL147c::kanMX4	BY4741	EUROSCARF
Y190	MATa, ura3-52, his3- Δ 200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ, cyh ^r 2, LYS2::GAL _{UAS} -HIS3 _{TATA} -HIS3	-	Harper <i>et al.</i> , 1993

Tab. 2.4 : Namen, Genotypen und Herkunft der verwendeten Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.9 Vektoren

Zur Klonierung und für die Expression in Hefen wurden die Pendelvektoren pRS313-316 sowie pRS423 (Sikorski und Hieter, 1989) eingesetzt. Diese können im Zellkern autonom replizieren und sind genetisch stabil. Zur homologen Rekombination ins Hefegenom wurden die Vektoren pRS303 und pRS304 (Sikorski und Hieter, 1989) verwendet. Folgende Plasmide wurden für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt:

Name des Plasmids	Donor
Cub-RGFP-CuP-pRS423	Norbert Lehming
Srp102-NuI-CuP-pRS314	Markus Albertsen
Nui-ha-Stop-CuP-pRS314	Nils Johnsson
NuI-Sec22-CuP-pRS314	H. D. Schmitt
NuI-Snc1- CuP-pRS314	Nils Johnsson
NuI-Ste14-CuP-pRS314	Nicole Lewke
NuI-Tom22-CuP-pRS314	Sonja Kind
NuI-Tpi1- CuP-pRS314	Nils Johnsson
NuI-Vam3-CuP-pRS314	Nils Johnsson
pAD-GAL4 JuBel 2.III.1	Judith Müller
pBD-GAL4 cam Bkn 3Δ2	Judith Müller
pEW88 (GFP-SKL)	Ewald Hettema / Ben Distel
pEW159 (Pex11-ha)	Ewald Hettema / Ben Distel
Ste14-Cub-RUra3-CuP-pRS313	Nicole Lewke
Ste14-Cub-RUra3-PMet-pRS313	Nicole Lewke
Tom20-Cub-RUra3-PMet-pRS313	Sonja Kind

Tab. 2.5: Plasmide, die für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.10 Licht- und Fluoreszenzmikroskop

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Leica DMRB Mikroskop (Leica, Solms) durchgeführt und mit einer Hitachi HV-C20A Digitalkamera dokumentiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde als Fluoreszenzlichtquelle eine Xenon-75W-GFP / XBO75 in Siemens VXHC 75/100 ZKF-1B (Siemens, Fürth) und der Filter L4 (Leica, Solms) verwendet. Die Anregungswellenlänge lag bei 490 nm, die maximale Intensität der Emission lag bei einer Wellenlänge von 508-510 nm, die Grenzwellenlänge des Filters betrug 500 nm.

2.1.11 Sonstige bildgebende Verfahren

Zur Abbildung der Wachstumstests von Hefen wurde ein Agfa Studio-Scan IIsi (Agfa, Leverkusen) eingesetzt. Für einige der Komplementationstests auf Ölsäure haltigen Medien wurde eine Olympus

Camedia C-2500L Digitalkamera (Olympus, Tokio, Japan) verwendet. Western Blots wurden mittels eines Lumi-Imager[®] (Boehringer, Mannheim) analysiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNS aus *S. cerevisiae*

Eine 10 ml Hefekultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 2 - 3 angezogen. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 10 min bei 3500 U/min (Heraeus Varifuge 3.2 RS) geerntet und in H₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und auf 300 µl Glasperlen (425-600 µm, säuregewaschen) pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol wurden die Zellen durch dreiminütiges Vortexen aufgeschlossen, mit 200 µl TE-Puffer versetzt und bei 13000 U/min in einer Tischzentrifuge (Heraeus) für 5 min zentrifugiert. Die gen. DNS enthaltende wässrige (obere) Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde die wässrige Phase abgenommen, 1 ml Ethanol zugegeben und 2 min zentrifugiert (s.o.). Das DNS-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Die im Präzipitat enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 8 µl RNase (1 mg/ml) und einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C abgedaut. Nach wiederholter Ethanolfällung wurde die genomische DNS in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Lysispuffer: 2% (V/V) Triton X-100; 1% (V/V) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8;
1 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA

2.2.1.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* ("Minipräp")

Von einer LB-Agarplatte mit Ampicillin (2 g/l) wurde eine Einzelkolonie in das entsprechende Medium überführt und üN bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugation bei 6000 U/min (Heraeus-Tischzentrifuge) für 5 min bei RT geerntet. Das Bakterienpellet wurde in STETL-Puffer und 7,5 µl Lysozym (10 mg/l) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die Probe 40 sec gekocht und anschließend 20 min bei 13000 U/min (Heraeus-Tischzentrifuge) und RT zentrifugiert. Die Pellets aus den entstandenen Zelltrümmern wurden mit einem Zahnstocher entfernt. Die Plamid-DNS wurde nach Zugabe von 150 µl Isopropanol aus dem

Überstand durch Zentrifugation bei 13000 U/min (Heraeus-Tischzentrifuge) für 20 min bei RT gefällt. Das DNS-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem (V/V) Ethanol gewaschen, wie vorher 5 min zentrifugiert, getrocknet und schließlich in 50 µl TE gelöst.

STETL-Puffer: 8% (M/V) Saccharose, 5% (V/V) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA

2.2.1.3 Enzymatische Behandlung von DNS

2.2.1.3.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Enzyme mit Hexamererkennungssequenzen verwendet. Für einen analytischen Verdau wurde 1 µg DNS mit 1 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Reaktion wurde der jeweilige Puffer des Herstellers verwendet. Bei einem präparativen Verdau wurden 5 µg DNS eingesetzt. Die Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und bei Bedarf entsprechend 2.2.1.9 aus dem Gel eluiert.

2.2.1.3.2 Alkalische Phosphatase Behandlung

Wurde die Vektor-DNS nur mit einem einzigen Enzym geschnitten, erfolgte anschließend eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP). Hierbei wurden die 5'-Phosphat-Reste beseitigt und damit die Selbstligation des linearisierten Vektors vermindert.

2.2.1.3.3 Ligation

Die kovalente Verknüpfung (Ligation) zweier DNS-Moleküle (Plasmid und einzufügendes DNS-Fragment) mit kohäsiven Enden erfolgte mittels T4-DNS-Ligase. Dabei wurden jeweils 20-50 ng Vektor-DNS eingesetzt. Das einzufügende DNS-Fragment wurde in doppelter molarer Menge hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNS-Ligase (2 U/µl) versetzt, auf 10 µl mit H₂O aufgefüllt und üN bei RT inkubiert.

PCR-Produkte wurden ohne vorherigen Restriktionsverdau in den pCR2.1 Vektor ligiert. Hierfür wurden die PCR-Produkte vorher 20 min mit Taq DNS-Polymerase bei 72°C inkubiert. Diese DNS-Polymerase fügt am 3'-Ende ein einzelnes Adenosinnukleotid hinzu, das die Ligation in den pCR2.1 Vektor ermöglicht, der über ein 5'- überstehendes Thyminnukleotid verfügt. Die Ligation erfolgte hier gemäß Herstellerangaben.

2.2.1.3.4 Behandlung mit Klenow-Polymerase

Zur Deletion von Restriktionsschnittstellen wurde die Plasmid-DNS mit der betreffenden Restriktionsendonuklease geschnitten, deren Zielsequenz zerstört werden sollte. Die von dem Enzym erzeugten 5'-überhängenden Enden wurden mit der Klenow-Untereinheit der Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl, bestehend aus 5 µl geschnittener Plasmid-DNS, 5 µl Restriktionspuffer, 2,5 µl (10 mg/ml) BSA, 1 µl 1mM dNTP (Roche Diagnostics, Mannheim), 1,5 µl (2 U/µl) Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 35 µl destilliertem Wasser. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, das Enzym nachfolgend 10 min bei 75°C deaktiviert und die DNS anschließend wie unter 2.2.1.12 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde das Plasmid religiert (2.2.1.3.3).

2.2.1.4 Kompetente Zellen und Transformation in *E. coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen von *E. coli* wurden 100 ml LB-Medium mit einer 3 ml üN-Kultur angeimpft. In diesem Volumen wurden die Zellen bis zu einer deutlichen Eintrübung bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde dann auf 500 ml LB-Medium aufgefüllt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Nach Abkühlen auf Eis für 30 min wurden die Zellen durch eine zehnmünütige Zentrifugation (3500 U/min, 4°C, JA14 Rotor) geerntet. Das Zellpellet wurde in eiskaltem Tfb1-Puffer auf Eis resuspendiert und erneut abzentrifugiert (s.o.), in 20 ml eiskaltem Tfb2-Puffer aufgenommen und in Portionen von 100 µl aliquotiert. Je nach Bedarf wurden die Zellen direkt transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden je 100 µl der kompetenten Zellen mit 4 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNS versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann für 5 min einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt, anschließend mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf LB-Amp-Platten ausplattiert.

Tfb1-Puffer: 30 mM Kaliumacetat
 50 mM MnCl₂
 100 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 15% (V/V) Glycerol

TfB2-Puffer:	12,5 mM Na-MOPS, pH 7
	12,5 mM KCl
	95 mM CaCl ₂
	18,75% (V/V) Glycerol

2.2.1.5 Kompetente Zellen und Transformation in *S. cerevisiae*

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde die Lithium-Acetat-Methode nach Gietz *et al.* (1992) angewendet. 300 ml YPD- bzw. entsprechendes SD-Medium wurden mit einer 30 ml üN-Kultur des entsprechenden Stammes so angeimpft, dass sich eine OD_{600nm} von 0,2 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (4500 U/min, 8 min, RT, JA14 Rotor) geerntet. Nach einem Waschschrift in H₂O wurde das Zellpellet in 1,5 ml eiskalter LiAc-TE-Lsg. auf Eis resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die Zellen konnten sofort zur Transformation verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Für eine Hefetransformation wurde zunächst gescherte Lachssperma-DNS (10 mg/ml) durch zehnmütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. 10 µl dieser DNS-Lösung wurde dann zu einem Aliquot kompetenter Hefezellen gegeben. Anschließend wurden 1 µg Plasmid-DNS und 600 µl LiAc-TE-PEG-Lsg. hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde dann 30 min bei RT geschüttelt. Danach erfolgte eine Zugabe von 70 µl DMSO und ein zehnmütiger Hitzeschock bei 42°C. Bei temperatursensitiven Hefestämmen wurde die Temperatur des Hitzeschocks auf 37°C reduziert. Zuletzt wurden die Zellen ca. 10 sec bei 10000 U/min (Tischzentrifuge) pelletiert, in 100 µl 1 x TE aufgenommen und auf entsprechenden selektiven SD-Platten (2.1.6) ausplattiert.

10 x TE:	100 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA
10 x LiAc:	1 M Li-Acetat, pH 8
LiAc-TE-Lsg.:	1 ml 10 x LiAc, 1 ml 10 x TE, 8 ml H ₂ O
LiAc-TE-PEG-Lsg.:	1 ml 10 x LiAc, 1 ml 10 x TE, 50% (M/V) PEG (durchschnittliches MW 3350 Da)

2.2.1.6 Homologe Rekombination

Um Plasmide homolog in das Hefegenom zu integrieren, wurde eine integrative Transformation nach Hinnen *et al.* (1978) durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmid an einer einmaligen Schnittstelle im Hefegenom durch eine Restriktionsendonuklease linearisiert. Zur Kontrolle der vollständigen Restriktion wurden 3 µl des Restriktionsansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der verbleibende Ansatz wurde für eine Hefetransformation (2.9.5) eingesetzt. Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels PCR überprüft. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.5 aufgeführt. Analog wurden bei der Integration von PCR-Produkten ins Hefegenom verfahren (vgl. 2.2.1.15), wobei 10 µl bis zu 50 µl des 100 µl umfassenden PCR-Ansatzes eingesetzt wurden.

2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine PCR wurde ca. 1 pg Plasmid-DNS als Matrize verwendet. Der PCR-Ansatz bestand zusätzlich aus 0,2 mM Desoxynukleotiden (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot), 0,4 µM Primern (sense und antisense), 10 µl 10 x Taq-Polymerase-Puffer des Herstellers und 1 µl Taq-DNS-Polymerase (1 U/µl). Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl in einem Tri-Block PCR Heizblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Folgendes Temperaturprogramm wurde zyklisch durchlaufen: 95°C, 30 sec (Aufschmelzen der DNS); 55°C, 30 sec (Bindung der Primer); 72°C, 1 min (Synthese des komplementären Stranges).

Alternativ wurde eine analytische PCR auf mit Plasmid-DNS transformierten Hefen durchgeführt. Hierzu wurde eine Hefekolonie in den PCR-Ansatz (s.o.) gegeben und die Taq-DNS-Polymerase erst nach einer 15 min Inkubation des Ansatzes bei 98°C (Aufbrechen der Hefezellen) hinzugegeben. Die Analyse des amplifizierten DNS-Abschnitts erfolgte elektrophoretisch.

Für eine präparative PCR wurde genomische Hefe-DNS als Matrize und PWO (mit Korrekturaktivität) als DNS-Polymerase (5 U/µl) mit dem entsprechenden 10 x PCR-Puffer des Herstellers eingesetzt (Boehringer, Mannheim).

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Elektrophoresen wurde die DNS in Gelen mit 1 - 2% (M/V) Agarose in 1 x TAE aufgetrennt. Die horizontalen Agarosegele wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben angefertigt. Vor dem Auftragen wurde die DNS-Probe mit 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer versetzt und in die Probenflasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE bei

80-150 V. Als Größenstandard wurde 1 kB-DNS-Leiter von Gibco-BRL (Eggenstein) verwendet. Die aufgetrennten DNS-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und durch Photographie dokumentiert.

50 x TAE: 242 g Tris, pH 8; 57,1 ml Tris-Acetat; 37,2 g EDTA auf 1 l

6 x Probenpuffer: 0,6 M Tris-HCl, pH 8; 50 mM EDTA; 60% (V/V) Glycerol; 0,25% (M/V) Bromphenolblau

2.2.1.9 Elution von DNS aus Agarosegelen

Nachdem die DNS-Fragmente präparativ im Agarosegel aufgetrennt worden waren, wurden sie unter UV Licht ausgeschnitten. Die Elution der DNS erfolgte mittels DNS-Extraktionskit (Machery-Nagel, Schweiz) laut Herstellerangaben. Die DNS wurde hierbei aus der Gelmatrix gelöst und anschließend an eine Silicagelmembran gebunden, gewaschen und mit H₂O eluiert.

2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration von DNS-Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht dabei 20 µg/ml Oligonukleotid oder 50 µg/ml doppelsträngiger DNS. Da die aromatische Restgruppe in Proteinen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, konnte durch den Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} die Reinheit einer DNS-Lsg. abgeschätzt werden.

2.2.1.11 Extraktion von DNS

Zur Abtrennung von Proteinen wurde die DNS-Lösung zuerst mit einem Volumen Phenol und anschließend mit einem Volumen Chloroform (Chloroform/Amylalkohol=24:1) extrahiert. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation (13000 U/min, 1 min, Tischzentrifuge). Die DNS enthaltende wässrige Phase wurde nach der Extraktion gefällt (2.2.1.12).

2.2.1.12 Fällung von DNS

Zur Fällung von DNS wurden der Lösung 0,1 Volumen 5 M Ammoniumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Das Präzipitat wurde bei 13000 U/min 20 min (Tischzentrifuge) abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde vakuumgetrocknet, in H₂O oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.1.13 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzanalyse von DNS wurde von der ADIS-Sequenzierungsgruppe des MPI, Köln durchgeführt. Hierfür wurden die DNS-Lösungen, die mittels Minipräp (2.2.1.2) hergestellt wurden, durch DNS-Extraktion (2.2.1.11) und -Fällung (2.2.1.12) vorbereitet.

2.2.1.14 Konstruktion der verwendeten Vektoren

Alle verwendeten Hefegene wurden mittels präparativer PCR aus dem Hefegenom amplifiziert (2.2.1.7). Nach einer Subklonierung der Amplifikate in pCR2.1 (Invitrogen, Niederlande) (2.2.1.3.3) wurden die Gen-Inserte in entsprechende Vektoren kloniert. Die Quellen der Ausgangsvektoren, die für die Klonierungen eingesetzt wurden, sind 2.1.9 zu entnehmen. Sofern nicht anders angegeben wurde bei allen Konstrukten der *CUPI*-Promotor verwendet. Eine schematische Darstellung der exprimierten Proteine befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Im Folgenden sind die verwendeten Oligonukleotide, die benutzten Restriktionsendonukleasen und das klonierte Plasmid angegeben.

Name	Sequenz (5-3)	Stelle	Konstrukte
PEX6N1 (Pex1)	GGC CCG <u>GGA TCC</u> CTG GGG ACA CGA CGA CCA AGA GGT TGA AG	<i>Bam</i> HI	NuI-Pex1-CuP-pRS304
PEX6N2 (Pex1)	GGC CCG <u>GGT ACC</u> AAG TCT CAC CTG GGG TAA CTA	<i>Kpn</i> I	NuI-Pex1-CuP-pRS304
PEX6C1 (Pex1)	GGC CCG <u>GTC GAC</u> CCC CCC ATA AGG GAG AGT CGG CTA CC	<i>Sal</i> I	Pex1-Cub-RUra3-PMet-pRS303
Pex6C2 (Pex1)	CCT CCC <u>CGG CCG</u> GCG CAT TGT TAA GAC CGG GAA	<i>Eag</i> I	Pex1-Cub-RUra3-PMet-pRS303
Pex2delta	CCT CCG <u>GAA TTC</u> ATG TGC GCG ACG AGG TTC CTG CCA	<i>Eco</i> RI	Pex2 Δ N-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex23	CCT CCG <u>GAA TTC</u> ATG TCT CGA GTT GCA CAG CTC	<i>Eco</i> RI	Pex2-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex24	GCC TCC <u>GTC GAC</u> CCG TAC ACT GGT GAG GCG GTC AG	<i>Sal</i> I	Pex2-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex2 Δ N-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex3-Start-Neu	GCC CGC <u>ATC GAT</u> ATG GCC CCA AAT CAA AGA TC	<i>Cla</i> I	Pex3-Cub-RUra3-PMet-pRS313
P3NSal	CCG TCC <u>GTC GAC</u> CCA GGC TTG AAG GAA AAC GAG CT	<i>Sal</i> I	Pex3-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex3N	GCC TCC <u>GGA TCC</u> CTG GGG ATG CCC CAA ATC AAA GAT CAC GT	<i>Bam</i> HI	NuI-Pex3-CuP-pRS314
Pex3C	GCC TCC <u>GGT ACC</u> TCT TTG CCA ACG TTG GGC TAT	<i>Asp</i> 718 <i>Kpn</i> I	NuI-Pex3-CuP-pRS314
Pex4CRU1	CCT CCC <u>GAA TTC</u> ATG CCA AAC TTC TGG ATT CTT GAG	<i>Eco</i> RI	Pex4-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex4-6ha-PMet-pRS313 pBD-Pex4 ; pAD-Pex4

PEX4CRU2	CCT CCC <u>GTC GAC</u> CCA TGG TTG TTG ATC CGC TCT CTT TC	<i>SalI</i>	Pex4-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex4-6ha-PMet-pRS313 pBD-Pex4 ; pAD-Pex4
Pex4N	GCC TCC <u>GGA TCC</u> CTG GGG ATA AAC TTC TGG ATT CTT GAA AT	<i>BamHI</i>	NuI-Pex4-CuP-pRS314
Pex4C	CCT CCT <u>GGT ACC</u> GCG TGC ACT TGT CAA AAA	<i>Asp718</i> <i>KpnI</i>	NuI-Pex4-CuP-pRS314
Pex5I1	CCT CCC <u>GGA TCC</u> CTG GGG ACG ACG TAG GAA GTT GCT CAG TG	<i>BamHI</i>	NuI-Pex5-CuP-pRS304
Pex5I2	CCT CCC <u>GTC GAC</u> GGT ATT AGG GTA CTG AAA CCG	<i>SalI</i>	NuI-Pex5-CuP-pRS304
PEX5N	CCT CCC <u>GAA TTC</u> ATG GAC GTA GGA AGT TGC TCA	<i>EcoRI</i>	Pex5-Cub-RUra3-PMet-pRS313
PEX5C	CCC TCC <u>GTC GAC</u> CCA AAC GAA AAT TCT CCT TTA AA	<i>SalI</i>	Pex5-Cub-RUra3-PMet-pRS313
SKLSTOP	CCT CCC <u>GGT ACC GAA TTC</u> CTA TAG CTT GGA AGA TCC AGC	<i>Asp718</i> <i>KpnI</i> <i>EcoRI</i>	“SKL(N)” NuI-SKL-CuP-pRS314
PTSX	CCT CCC <u>GGT ACC</u> GGA AGA CCC AGA TCC AGC GTA ATC TGG AAC	<i>Asp718</i> <i>KpnI</i>	“SKLX” NuI-SSS-CuP-pRS314
Pex101	GCC TCC <u>GGA TCC</u> CTG GGG ATA AGA ATG ATA ATA AGT TGC AAA AGG	<i>BamHI</i>	NuI-Pex10-CuP-pRS314 NuI-Pex10-ΔRing-CuP-pRS314
Pex102	CCT CCG <u>GAA TTC</u> GCA TTA TTT CCC CTT CGC GTT TTA C	<i>EcoRI</i>	NuI-Pex10-CuP-pRS314 NuI-Pex10-ΔRing-CuP-pRS314
Pex103	CCT CCG <u>GAA TTC</u> ATG AAG AAT GAT AAT AAG TTG CAA AAG G	<i>EcoRI</i>	Pex10-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex10-6ha-PMet-pRS313 Pex10-Cub-RGFP-PMet-pRS423 Pex10-ΔRing-Cub-RUra3-PMet- pRS313
Pex104	GCC TCC <u>GTC GAC</u> CCT TGC CGC AGG ACC AGA ATT TC	<i>SalI</i>	Pex10-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex10-6ha-PMet-pRS313 Pex10-Cub-RGFP-PMet-pRS423 Pex10-ΔRing-Cub-RUra3-PMet- pRS313
Pex111	GCC TCC <u>GGA TCC</u> CTG GGG ATG TCT GTG ATA CAC TGG TAT AT	<i>BamHI</i>	NuI-Pex11-CuP-pRS314
Pex112	CCT CCG <u>GAA TTC</u> ATA CAG GTA TGG ACA TGG AAC	<i>EcoRI</i>	NuI-Pex11-CuP-pRS314
Pex113	CCT CCG <u>GAA TTC</u> ATG GTC TGT GAT ACA CTG GTA TAT	<i>EcoRI</i>	Pex11-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex11-Cub-RGFP-PMet-pRS423
Pex114	GCC TCC <u>GTC GAC</u> CCT GTA GCT TTC CAC ATG TCT TGC	<i>SalI</i>	Pex11-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex11-Cub-RGFP-PMet-pRS423
Pex12-C-Vw-RI	CGC GGG <u>AAT TCA</u> TGA GCT TTT ATT CAA ACC TAC	<i>EcoRI</i>	Pex12-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex12-NuI-CuP-pRS314
Pex12-Rev-SalI	CCG CCG <u>TCG ACC</u> CGA TTA GTA GCT TCC TAA TAC CTG	<i>SalI</i>	Pex12-Cub-RUra3-PMet-pRS313 NuI-Pex12-ha-Stop-CuP-pRs314 Pex12-NuI-CuP-pRS314
Pex12-Vor-RI/Bam	GCC GGC <u>GAA TTC</u> ATG GGG <u>ATC</u> CCT GGG GAC AGC TTT TAT TCA AAC CTA CCG	<i>EcoRI</i>	NuI-Pex12-ha-Stop-CuP-pRs314

RING1	CCT CCC <u>GAA TTC</u> ATG TCC TCA CAT AGT GAC AAA ACG GAA	<i>EcoRI</i>	Pex12-Ringdom-Cub-RUra3-PMet- pRS313
RING2	CCT CCC <u>GTC GAC</u> CCT GAG GAG AAA GGC GGC CTT GG	<i>SalI</i>	Pex12-Ringdom-Cub-RUra3-PMet- pRS313
P1Ring	CCT CCC <u>GAA TTC</u> ATG TCC TCA CAT AGT GAC AAA ACG GAA	<i>EcoRI</i>	Pex12-ΔRing-Cub-RUra3-Pmet- pRS313
P12-Ring	CCT CCC <u>GTC GAC</u> CCT GAG GAG AAA GGC GGC CTT GG	<i>SalI</i>	Pex12-ΔRing-Cub-RUra3-Pmet- pRS313
Pex13-Bam-Vw	GCC CGG <u>GAT CCC</u> TGG GGA CTC ATC CAC AGC AGT ACC ACG	<i>BamHI</i>	NuI-Pex13-ha-Stop-CuP-pRS314
Pex13-ATG	CCC <u>CGA ATT CAT</u> GTC ATC CAC AGC AGT ACC	<i>EcoRII</i>	Pex13-Cub-RUra3-pRS303 Pex13-Cub-RUra3-CuP-pRS313 Pex13-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex13-Rev-Xho	CCC <u>CCT CGA GCC</u> GTG TGT ACG CGT TTC ATC ATC	<i>XhoI</i>	Pex13-Cub-RUra3-pRS303 Pex13-Cub-RUra3-CuP-pRS313 Pex13-Cub-RUra3-PMet-pRS313 NuI-Pex13-ha-Stop-CuP-pRS314
Pex14-CRU-Vw	CCT CCG <u>AAT TCA</u> TGA GTG ACG TGG TCA GTA AA	<i>EcoRI</i>	Pex14-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex14-CRU-Rv	CCT CCG <u>TCG ACC</u> CTG GGA TGG AGT CTT CGA CCT G	<i>SalI</i>	Pex14-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex14-Nux-Vw	CCT CCG <u>GAT CCC</u> TGG GGA CAG TGA CGT GGT CAG TAA AG	<i>BamHI</i>	NuI-Pex14-CuP-pRS314
Pex14-Nux-Rv	CCT CCG <u>TCG ACG</u> CAA ATG TTC CGG GTA ACA AT	<i>SalI</i>	NuI-Pex14-CuP-pRS314
Pex15-Vw	<u>GGA TCC</u> CTG GGA GTG CTG CAA GTG AGA TAA TGA	<i>BamHI</i>	NuI-Pex15-CuP-pRS314
Pex15-Rw	<u>GGT ACC</u> ATG TCT AGC AAA CGA TGT	<i>KpnI</i>	NuI-Pex15-CuP-pRS314
Pex171	CCT CCG <u>GAA TTC</u> ATG ACA TCG ATT AAC AGT TTT CCC	<i>EcoRI</i>	Pex17-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex172	GCC TCC <u>GTC GAC</u> CCC CTT GGC ACT TGG CCA TTC AC	<i>SalI</i>	Pex17-Cub-RUra3-PMet-pRS313
Pex19-Vw	CCT CCG <u>GAT CCC</u> TGG GGA CCC AAA CAT ACA ACA CGA AG	<i>BamHI</i>	NuI-Pex19-CuP-pRS314
Pex19-Rv	CCT CCG <u>TCG ACG</u> GCT TTG GCT TGC GGT AAC AAC G	<i>SalI</i>	NuI-Pex19-CuP-pRS314
PEX22N	CCT CCC <u>GAA TTC</u> ATG CCA CCA CCA TCA AGA AGT AGA	<i>EcoRI</i>	Pex22-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex22-NuI-CuP-pRS314
Pex22C	CCT CCC <u>GTC GAC</u> CCA TTG CAT AAA GTG TCA ATC AG	<i>SalI</i>	Pex22-Cub-RUra3-PMet-pRS313 Pex22-NuI-CuP-pRS314
SPG1	CCT CCC <u>ATC GAT</u> ATG TCT GAC AAG GAA CAA ACG	<i>Cla I</i>	Ady2-Cub-RUra3-PMet-pRS313
SPG2	CCC TCC <u>GTC GAC</u> CCA AAG ATT ACC CTT TCA GTA GA	<i>Sal I</i>	Ady2-Cub-RUra3-PMet-pRS313

Tab. : 2.6 : Oligonukleotide, die zur Darstellung der verwendeten Gene von *Saccharomyces cerevisiae* durch PCR und anschließenden Klonierung zu den genannten Plasmiden eingesetzt wurden. In Spalte 2 unterstrichen sind die Konsensussequenzen der in Spalte 3 angegebenen verwendeten Restriktionsendonukleasen.

2.2.1.14.1 Klonierung von NuI-Pex1-CuP-pRS304

Der Vektor NuI-Sec61-CuP-pRS304 sowie ein PCR-Fragment der 5'-Region von Pex1 (bp 1-450) wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I geschnitten und *SEC61* durch *PEX1* ersetzt.

2.2.1.14.2 Klonierung von Pex1-Cub-RUra3-pRS303

Der Vektor Pxa1-Cub-RUra3-pRS303 sowie ein PCR-Fragment der 3'-Region von *PEX1* (580 bp) wurden mit den Restriktionsenzymen *Eag*I und *Sal*I geschnitten und *PXA1* durch *PEX1* ersetzt.

2.2.1.14.3 Klonierung von Pex2-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex2DN-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex4-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex5-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex10-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex11-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex12-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex12-Ringdom-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex12-DRing-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex14-Cub-RUra3-PMet-pRS313, Pex17-Cub-RUra3-PMet-pRS313 und Pex22-Cub-RUra3-PMet-pRS313

Das Plasmid Ste14-Cub-RUra3-PMet-pRS313 wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sal*I verdaut und diente als Vektor. Sämtliche hier aufgelisteten Inserts, die an die Stelle des *STE14* Gens traten, wurden ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Sal*I behandelt; entweder wurden unmittelbar die PCR-Produkte aufgereinigt und verdaut, oder aber sie waren zunächst in pCR2.1 Plasmide subkloniert worden und wurden hieraus geschnitten.

2.2.1.14.4 Klonierung von Pex3-Cub-RUra3-PMet-pRS313

Das Plasmid Ste14-Cub-RUra3-PMet-pRS313 wurde mit den Restriktionsenzymen *Cla*I und *Sal*I verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *PEX3* wurde gleichfalls mit *Cla*I und *Sal*I verdaut und ersetzte dann das *STE14* Gen im Vektor.

2.2.1.14.5 Klonierung von NuI-Pex3-CuP-PRS314, NuI-Pex4-CuP-PRS314 und NuI-Pex15-CuP-PRS314

Das Plasmid NuI-Snc1-CuP-pRS314 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Asp*718 verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *PEX3*, *PEX4* bzw. *PEX15* wurde gleichfalls mit *Bam*HI und *Asp*718 verdaut und ersetzte dann das *SNC1* Gen im Vektor.

2.2.1.14.6 Klonierung von Pex4-6ha-PMet-pRS313 und Pex10-6ha-PMet-pRS313

Das Plasmid Ste14-6ha-PMet-pRS313 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* verdaut und diente als Vektor. Die Vektoren Pex4-Cub-RUra3-PMet-pRS313 bzw. Pex10-Cub-RUra3-PMet-pRS313 wurden ebenfalls mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten, die *PEX4* bzw. *PEX10* tragenden Fragmente isoliert und mit dem Vektor ligiert, so dass das jeweilige *PEX* Gen das *STE14* Gen ersetzte.

2.2.1.14.7 Klonierung von pAD-Pex4 und pBD-Pex4

Die Two-Hybrid-Vektoren pAD-GAL4-2.1 und pBD-GAL4 Cam (Stratagene, Heidelberg) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* geschnitten und die *PEX4* Sequenz aus Pex4-Cub-RUra3-PMet-pRS313 mit den selben Enzymen isoliert und in die Vektoren integriert. Hierdurch entstanden auf den Pendelvektoren Fusionsgene aus der *GAL4*-Aktivierungsdomäne (Codon 761-881 von *GAL4*) und *PEX4* im Falle von pAD-GAL4-2.1 bzw. aus der *GAL4*-Bindedomäne (Codon 1-147 von *GAL4*) und *PEX4* im Falle von pBD-GAL4 Cam.

2.2.1.14.8 Klonierung von NuI-Pex5-CuP-pRS304

Der Vektor NuI-Sec61-CuP-pRS304 wurde mit *KpnI* restringiert, die Schnittstelle mit Klenow-Polymerase behandelt und religiert, um die entsprechende Schnittstelle zu deletieren. Der Vektor wurde dann mit *BamHI* und *SalI* geschnitten und ein gleich behandeltes PCR-Fragment der 5'-Region von Pex5 (bp 1-480) ersetzte *SEC61* durch *PEX5*.

2.2.1.14.9 Klonierung von NuI-Pex5-CuP-PRS314, NuI-Pex14-CuP-PRS314 und NuI-Pex19-CuP-PRS314

Das Plasmid NuI-Snc1-CuP-pRS314 wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SalI* verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *PEX5*, *PEX14* bzw. *PEX19* wurde gleichfalls mit *BamHI* und *SalI* verdaut und ersetzte dann das *SNC1* Gen im Vektor.

2.2.1.14.10 Klonierung von NuI-SKL-CuP-pRS314 und NuI-SSS-CuP-pRS314

Auf dem Vektor NuI-ha-Stop-CuP-pRS314 wurden mit dem CuPTerminal-Oligonukleotid und den PTSX- bzw. SKLSTOP-Oligonukleotiden (2.1.5) Polymerasekettenreaktionen durchgeführt, um die gewünschten Codons in die Sequenzen einzufügen. Vektor und PCR-Produkte wurden hinterher mit *BamHI* und *KpnI* geschnitten und zusammengefügt.

2.2.1.14.11 Klonierung von NuI-Pex10-CuP-PRS314 und NuI-Pex11-CuP-PRS314

Das Plasmid NuI-Snc1-CuP-pRS314 wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *EcoRI* verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *PEX10* bzw. *PEX11* wurde gleichfalls mit *BamHI* und *EcoRI* verdaut und ersetzte dann das *SNC1* Gen im Vektor.

2.2.1.14.12 Klonierung von NuI-Pex10-DRing und Pex10-DRing-Cub-RUra3-PMet-pRS313

Die Vektoren NuI-Pex10-CuP-pRS314 und Pex10-Cub-RUra3-PMet-pRS313 wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *SaII* verdaut und anschließend religiert. Hierdurch wurde die Sequenz von *PEX10* um die für die Ringdomäne kodierenden Bereiche verkürzt; die kohäsiven Enden von *XhoI* und *SaII* sind komplementär zueinander und im gleichen Leseraster.

2.2.1.14.13 Klonierung von Pex10-Cub-RGFP-PMet-pRS423 und Pex11-Cub-RGFP-PMet-pRS423

Das Plasmid Cub-RGFP-CuP-pRS423 wurde mit *EagI* und *SaII* verdaut und als Vektor eingesetzt. Auf die gleiche Weise wurden Pex10-Cub-RUra3-PMet-pRS313 und Pex11-Cub-RUra3-PMet-pRS313 behandelt und deren Inserts in den Vektor integriert, so dass CuP durch die Sequenz PMet-Pex10 bzw. PMet-Pex11 ersetzt wurde.

2.2.1.14.14 Klonierung von Pex12-NuI-CuP-pRS314 und Pex22-NuI-CuP-pRS314

Das Plasmid Srp102-NuI-CuP-pRS314 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SaII* verdaut und diente als Vektor. Die Plasmide Pex12-Cub-RUra3-PMet-pRS313 und Pex22-Cub-RUra3-PMet-pRS313 wurden ebenfalls mit *EcoRI* und *SaII* verdaut, so dass deren Insertsequenzen im Vektor die *HSP102* Sequenz durch *PEX12* bzw. *PEX22* ersetzen.

2.2.1.14.15 Klonierung von NuI-Pex12-ha-Stop-CuP-pRS314

Das Plasmid NuI-Guk1-ha-Stop-CuP-pRS314 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *PEX12* wurde gleichfalls mit *SalI* und *EcoRI* verdaut und ersetzte dann das *GUK1* Gen im Vektor.

2.2.1.14.16 Klonierung von NuI-Pex13-ha-Stop-CuP-pRS314

Das Plasmid NuI-Guk1-ha- Stop-CuP-pRS314 wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SalI* verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *PEX13* wurde mit *XhoI* und *BamHI* verdaut und ersetzte dann das *GUK1* Gen im Vektor; die kohäsiven Enden von *XhoI* und *SalI* sind komplementär zueinander und im gleichen Leseraster.

2.2.1.14.17 Klonierung von Pex13-Cub-RUra3-pRS303

Der Vektor Pxa1-Cub-RUra3-pRS303 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* geschnitten sowie ein PCR-Produkt von *PEX13* mit *EagI* und *XhoI* verdaut; die kohäsiven Enden von *XhoI* und *SalI* sind komplementär zueinander und im gleichen Leseraster. Die *PEX13* Sequenz ersetzte somit die *PXA1* Sequenz.

2.2.1.14.18 Klonierung von Pex13-Cub-RUra3-CuP-pRS313 und Pex13-Cub-RUra3-PMet-pRS313

Die Plasmide Pex13-Cub-RUra3-pRS303 und Ste14-Cub-RUra3-CuP-pRS313 wurden mit *EcoRI* und *ApaI* verdaut und Pex13-Cub-RUra3 somit hinter CuP in pRS313 kloniert. In einem weiteren Schritt wurde CuP in diesem Vektor über Restriktionsverdau mit *SacI* und *EcoRI* durch PMet aus Ste14-Cub-RUra3-PMet-pRS313 ersetzt.

2.2.1.14.19 Klonierung von Ady2-Cub-RUra3-PMet-pRS313

Das Plasmid Ste14-Cub-RUra3-PMet-pRS313 wurde mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *SalI* verdaut und diente als Vektor. Ein PCR-Produkt von *ADY2* wurde gleichfalls mit *ClaI* und *SalI* verdaut und ersetzte dann das *STE14* Gen im Vektor.

2.2.1.15 Deletion eines Gens im Hefegenom

Zur Deletion von Hefegenen wurde ein KanMX-Modul nach Güldener *et al.* (1996) verwendet. Es besteht aus dem dominanten Kanamycin-Resistenzgen aus *Escherichia coli* (Kan^R), dessen Expression durch die *TEF*-Promotor- und -Terminatorsequenzen aus *Ashbya gossypii* kontrolliert werden. Dieses Expressionsmodul wird von zwei LoxP-Sequenzen flankiert (loxP-KanMX-loxP) und befindet sich auf dem Vektor pUG6.

Zur Gendeletion wurde mit Hilfe einer präparativen PCR-Reaktion (2.2.1.7) ein PCR-Fragment erzeugt, welches sich aus der loxP-kanMX-loxP-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des zu deletierenden Gens zusammensetzte. Durch homologe Rekombinationsereignisse 5' und 3' des offenen Leserasters des zu deletierenden Gens wurde dieses PCR-Fragment in das Hefegenom integriert. Das gesamte offene Leseraster des zu deletierenden Gens wurde somit durch loxP-kanMX-loxP ersetzt. Für die Transformation in Zellen von *S. cerevisiae* (2.2.1.5) wurden 10 µl bis zu 50 µl des 100 µl umfassenden PCR-Ansatzes eingesetzt und die Transformanten zur Selektion auf YPD-Platten mit Geneticin (2.1.3 und 2.1.6) ausplattiert (Abb. 2.1).

Alternativ wurden Stämme von *S. cerevisiae*, die entsprechende KanMX-Kassetten am Genort des deletierten Gens besitzen, von der Stammsammlung EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, Frankfurt/Main) bezogen, genomische DNS dieser Zellen gewonnen (2.2.1.1) und Oligonukleotide einige hundert Basenpaare oberhalb, bzw. unterhalb des Genortes zur PCR eingesetzt. Somit ergaben sich größere homologe untranslatierte Bereiche 3' und 5' des zu deletierenden Gens, was die Effizienz der homologen Rekombination deutlich steigert. Im Übrigen wurde verfahren wie für die loxP-kanMX-loxP-Konstrukte beschrieben.

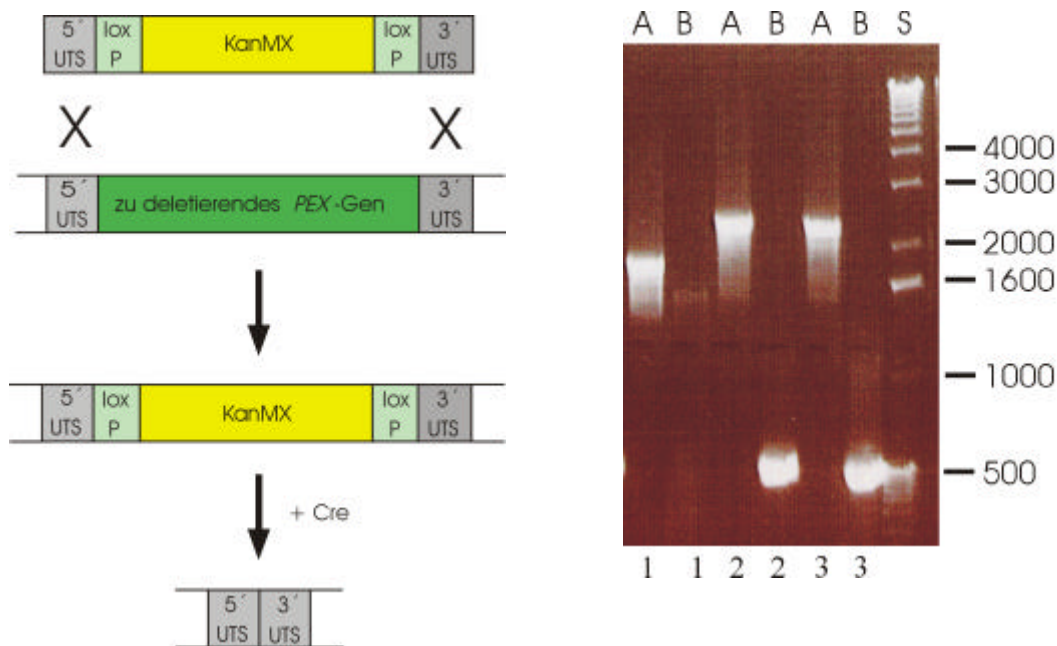


Abb. 2.1: Gendelektion durch homologe Rekombination des KanMX-Moduls an den Genlokus des zu deletierenden Gens und Ausschluß des KanMX-Markers.

Links: Schematische Darstellung: Ein PCR-Produkt aus der loxP-KanMX-loxP-Kassette flankiert von Sequenzen der untranslatierten 3'- und 5'-Regionen des Zielgens wird durch homologe Rekombination in das Genom der Hefe integriert. Das Gen der Hefe wird durch loxP-KanMX-loxP ersetzt und die Hefezellen sind in der Folge resistent gegen Kanamycin (kan^R). Durch Expression der Cre-Rekombinase in der Zelle wird die gesamte Kassette aus der genomischen DNS geschnitten und diese religiert, so dass die Zellen des Deletionsstammes wieder sensitiv gegen Kanamycin (kan^S) sind.

Rechts: JD53- Δpex3 -Zellen wurden mit einer entsprechenden KanMX-Kassette mit homologen Regionen zu den UTS von *PEX19* transformiert und genomische DNS von rekombinanten Zellen (1-3) per PCR analysiert. In PCR A wird auf die Gesamtlänge des Produktes zwischen des 3'- und 5'-UTR getestet (WT: ca. 1700 bp; Δpex19 : ca. 2300 bp). Die Oligonukleotide für PCR B binden in der KanMX-Kassette und 3' der verwendeten Homologieregion im Genom von JD-53 (WT: kein Produkt; Δpex19 : ca. 500 bp). S = DNS-Größenstandard. Klone 2 und 3 sind JD53- $\Delta\text{pex3/19}$, Klon 1 nicht.

Wurde die Deletion des Gens mit einem PCR-Produkt auf dem pUG6 Plasmid durchgeführt, so konnte anschließend der Marker Kanamycinresistenz wiedergewonnen werden. Durch die Expression der Cre-Rekombinase in der Zelle mittels des pSH47 Plasmides (Güldener *et al.*, 1996) wird die Excision des loxP-KanMX-loxP-Moduls induziert, so dass die Zelle das deletierte Gen und die KanMX4-Kassette verliert (Abb. 2.1). Auf diese Weise können mehrere Gene in der gleichen Zelle ohne Verlust von Markern eliminiert werden (JD53- $\Delta\text{pex3/11}$, JD53- $\Delta\text{pex3/19}$, siehe 2.1.8).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Gesamtproteinextraktion aus *S. cerevisiae*

10 ml einer Hefekultur wurden im entsprechenden Medium bis zu einer OD_{600nm} von 1 wachsen gelassen. Die Hefezellen wurden durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 3500 U/min (Heraeus Varifuge 3.2 RS) geerntet und in 150 μ l Lysispuffer, versetzt mit je 1/40 Volumen 2 M NEM und 4,1 mM PMSF, aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 150 μ l Glasperlen (425-600 μ m, säuregewaschen) pipettiert und die Zellen durch sechsfaches Vortexen und Kühlen auf Eis für je 30 sec aufgeschlossen. Zelltrümmer und Glasperlen wurden 10 min bei 13000 U/min und 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417 R) abzentrifugiert und der Proteinüberstand abgenommen. 50 μ l des Überstands wurden mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt; parallel dazu wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (2.2.2.2).

Lysispuffer:	50 mM Hepes, pH 7,5
	150 mM NaCl
	2,5 mM EDTA
	1% (V/V) Triton X-100
2 x SDS-Probenpuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 6,8
	4% (V/V) β -Mercaptoethanol
	4% (M/V) SDS
	20% (V/V) Glycerol
	0,01% (M/V) Bromphenolblau

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Um die Gesamtproteinkonzentration nach der Extraktion (2.2.2.1) zu bestimmen, wurde der Farbstoffbindungstest nach Bradford (1976) durchgeführt. Für jede Extraktion wurden zwei Werte bestimmt, indem jeweils 5 μ l des Proteinüberstandes abgenommen wurden. Diese wurden mit 200 μ l H_2O und 800 μ l Bradfordreagens (Amresco, USA) versetzt. Nach 15 - 30 minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in Referenz zum Leerwert gemessen. Hieraus errechnete sich die relative Proteinmenge, die auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurde, um die gleiche Proteinmengen der einzelnen Extrakte zu erhalten.

2.2.2.3 SDS-PAGE

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Für die Gelelektrophorese wurde das Gelsystem von Hoefer (Freiburg i. Br.) verwendet; die Abmessungen der Gele betragen 18 cm x 16 cm x 0,75 mm. Die Proben wurden zur vollständigen Denaturierung aufgekocht und zusammen mit einem Molekulargewichts-standard (2.1.4) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für das Sammelgel und 220 V für das Trenngel.

Lösung	10 % Trenngel	12 %	Sammelgel
30% (M/V) Acrylamidlösung	5,0 ml	6,0 ml	1,2 ml
Dest. Wasser	6,0 ml	5,0 ml	5,8 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml	---
1 M Tris-HCl, pH 6,8	---	---	1,0 ml
10% (M/V) SDS	150 µl	150 µl	80 µl
10% (M/V) APS	150 µl	150 µl	80 µl
TEMED	6,6 µl	6,6 µl	6,5 µl

Tab. 2.7: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgele.

2.2.2.4 Western Blot Analyse

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran erfolgte durch halbtrockenes Elektrotansferverfahren (Transfer nach Kyhse-Andersen, 1984). Hierzu wurde das Gel auf die Membran gelegt, die zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurde. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese vor der Äquilibrierung in Methanol getränkt. Der Transfer erfolgte zwischen je drei Lagen Whatman-Papier in einem Semiphor-Blotapparat (Hoefer, Freiburg i. Br.) bei konstanter Stromstärke von 250 mA für 60 min. Anschließend konnten die transferierten Proteine mit Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt werden. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Waschen mit H₂O. Um nach dem Transfer noch freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde in HBST mit 5% (M/V) Magermilchpulver leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde lang mit dem ersten Antikörper inkubiert, der in HBST mit 5% (M/V) Magermilchpulver verdünnt wurde. Es erfolgte dann ein mehrmaliges Waschen in HBST für eine Stunde. Es schloss sich eine einstündige Inkubation mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten und an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper an, der ebenfalls in HBST mit 5% (M/V) Magermilchpulver verdünnt wurde. Die Membran wurde erneut eine Stunde lang mehrmals mit HBST gewaschen. Der Nachweis der Peroxidase des zweiten Antikörpers

erfolgte mit dem ECL-Kit (Pierce, USA) nach Herstellerangaben. Die Detektion der Lichtemission erfolgte entweder durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak, USA) oder mittels Lumi-Imager (2.1.11).

Nach dem Ablösen des ersten und zweiten Antikörpers (Strippen) konnte die Membran erneut genutzt werden. Die Membran wurde dazu 30 min bei 50°C unter Schütteln in 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol und 2% (M/V) SDS inkubiert und anschließend zwei Mal für je 15 min mit HBST gewaschen.

Transferpuffer (1l):	2,9 g Tris-Base
	14,3 g Glyzin
	200 ml Methanol
	5 ml 10% (M/V) SDS
Ponceau S-Lsg.:	0,25% (M/V) Ponceau S
	15% (V/V) Essigsäure
	40% (V/V) Methanol
HBST:	150 mM NaCl
	20 mM Hepes, pH 7,5
	0,2% (V/V) Tween 20

2.2.2.5 Koimmunopräzipitation peroxisomaler Membranproteine

Eine 30 ml Vorkultur von Hefezellen in selektivem Flüssigmedium (2.1.6) wurde verwendet, um 300 ml desselben Flüssigmediums auf eine OD_{600} von 0,3 anzupflanzen. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 – 1,0 unter Schütteln bei 30°C weiter inkubiert. Nach der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation bei 3500 U/min (Beckman J2-21, Rotor JA-14) bei RT wurden die Zellen in sterilem bidestillierten Wasser gewaschen. Nach einer weiteren Pelletierung unter den obigen Bedingungen wurde das Pellet (Nassgewicht ca. 1g) in 3 ml eiskaltem IP-Puffer aufgenommen und in verschraubbare 10 ml Glasröhrchen gegeben, die je 3 g säuregewaschene Glaskügelchen (Durchmesser 425-600 μ m) enthielten und ebenfalls vorgekühlt waren. Es folgten 15 Schritte heftigen Schüttelns auf einem Vortexer für jeweils 30 s, unterbrochen von jeweils 30 s Abkühlens auf Eis. Der wässrige Überstand dieses Aufschlusses wurde in Zentrifugenröhrchen aus Polyethylen (Roth, Karlsruhe) überführt und für 15 min bei 5000 \times g und 4°C (Beckman J2-21,

Rotor JA-14) zentrifugiert, um Zelltrümmer, unaufgebrochene Zellen und Mitochondrien abzentrifugieren. Der Überstand wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei 4°C und 14.000 U/min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5417R, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und je 5 µl des primären Antikörpers zugesetzt. Die Proben inkubierten unter ständiger langsamer Inversion bei 4°C für 60 min, bevor je 25 µl Protein A-Sepharose Kugeln (Boehringer, Mannheim / Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben wurden. Auch diese inkubierten unter ständiger langsamer Inversion bei 4°C mindestens für zwei Stunden. Hierauf wurden die Sepharosekügelchen durch langsames Anzentrifugieren bis ca. 3500 U/min pelletiert, der Überstand abgenommen und Proben hiervon für eine Standardisierung der Proteinmenge im Überstand mit SDS-Probenpuffer (2.2.2.1) versetzt, aufgeköcht und eingefroren. Anschließend wurden die Proben mit je 2 ml IP-Puffer gewaschen. Diese Waschschrte wurden je dreifach wiederholt, nach dem letzten Waschschrte wurde das Pellet mit 80 µl SDS-Probenpuffer (2.2.2.1) versetzt und 15 min bei 100°C aufgeköcht. Abschließend wurden die Proben sofort auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (2.2.2.3) oder eingefroren.

IP-Puffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	50 mM	NaCl
	0,2 % (V/V)	Triton X-100
	0,02 % (V/V)	PMSF
	15 µg/ml	Antipain
	1,5 µg/ml	Pepstatin A
	1,0 µg/ml	Leupeptin
	0,1 µg/ml	Chymostatin

2.2.2.6 Chemische Kreuzvernetzung

Eine 100 ml Vorkultur von Hefezellen in selektivem Flüssigmedium (2.1.6) wurde verwendet, um 500 ml desselben Flüssigmediums auf eine OD₆₀₀ von 0,5 anzuimpfen. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,5 – 2,0 unter Schütteln bei 30°C weiter inkubiert. Nach der Pelletierung der Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 1500×g und 4°C wurde das Nassgewicht des Zellpellets als Differenz aus dem Trockengewicht der Zentrifugenbecher und dem Gewicht nach dem Abgießen des Überstandes ermittelt. Es wurde angenommen, dass das Nassgewicht in Gramm in

etwa dem Zellvolumen in dichter Packung in Millilitern entspricht, und dieses wurde für alle weiteren Schritte als ein Volumen (Vol) definiert. Die Zellen wurden nun mit 2 bis 4 Vol eiskaltem sterilen Wasser gewaschen, bei 1500×g und 4°C fünf Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 1 Vol Lyticase-Puffer mit 30 mM DTT resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt erleichtert die nachfolgende Behandlung mit Lyticase, indem Disulfidbindungen aufgebrochen werden. Die Zellen wurden anschließend bei 1500×g und 4°C fünf Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 3 Vol Lyticase-Puffer resuspendiert. Dann wurden 200 U Lyticase (Sigma, Deisenhofen) pro originalem Zellvolumen (entspricht etwa 2 mg/Vol) zugegeben und die Zellsuspension 40 min bei 30°C auf einem Schüttler bei langsamer Rotation inkubiert (~50 U/min). Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die vollständige Konversion in Spheroblasten durch Lyse in Wasser mikroskopisch kontrolliert und ggf. die Inkubation fortgesetzt, bis der Spheroblastierungsprozess vollständig war.

Die Zellen wurden nun bei 1500×g und 4°C fünf Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 10 Vol eiskaltem Kreuzvernetzungspuffer gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, die Zellen anschließend in 1 Vol eiskaltem Kreuzvernetzungspuffer resuspendiert und durch zehn vollständige Kolbenbewegungen in einem Glas-Douncer auf Eis aufgeschlossen. Das Kreuzvernetzungsreagens DSP (Pierce, USA) wurde in DMSO gelöst und zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml zu den Lysaten gegeben. Die Extrakte wurden 30 min bei 23°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe eines Überschusses von Glycin (alternativ Hydroxylamin oder Tris) zu einer Konzentration von 20 mM abgesättigt. Den Lysaten wurden nun je 5 µl des primären Antikörpers zugesetzt. Die Proben inkubierten unter ständiger langsamer Inversion bei 4°C für 60 min, bevor je 25 µl Protein A-Sepharose Kugeln (Boehringer, Mannheim / Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben wurden. Auch diese inkubierten unter ständiger langsamer Inversion bei 4°C mindestens für zwei Stunden. Anschließend wurden die Sepharosekügelchen durch langsames Anzentrifugieren bis ca. 3500 U/min pelletiert, der Überstand abgenommen und Proben hiervon für eine Standardisierung der Proteinmenge im Überstand mit SDS-Probenpuffer (2.2.2.1) versetzt, aufgeköcht und eingefroren. Anschließend wurden die Proben mit je 2 ml Kreuzvernetzungspuffer gewaschen. Diese Waschschrift wurden je fünffach wiederholt, nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet mit 100 µl SDS-Probenpuffer (2.2.2.1) und zusätzlichen 5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 30 min bei 100°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben sofort auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (2.2.2.3) oder eingefroren.

Kreuzvernetzungspuffer:	100 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
	1 mM	EDTA
	0,02 % (V/V)	PMSF
	15 µg/ml	Antipain
	1,5 µg/ml	Pepstatin A
	1,0 µg/ml	Leupeptin
	0,1 µg/ml	Chymostatin
Lyticasepuffer:	50 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
	10 mM	MgCl ₂
	1 M	Sorbitol
	1 mM	DTT
DSP (frisch!)	25 mM	in DMSO

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Physiologische Wachstumstests (Interaktionstests)

Hefezellen, die jeweils ein Plasmid mit dem Cub-RUra-Modul und eines mit einem Nub-Fusionsgen exprimierten, wurden auf selektive SD-Festmedien (2.1.6) ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in sterilem destilliertem Wasser so verdünnt, dass sich in einem Volumen von 3,75 µl eine definierte Zellzahl befand (bei OD₆₀₀ von 1,0 etwa 10.000 Zellen). Weiter wurden Verdünnungsreihen von 1:10, 1:100 und 1:1000 (also entsprechend 1000, 100 und 10 Zellen) angelegt und die Hefen auf SD-Nährplatten aufgetropft, die auf die Anwesenheit der Plasmide selektionierten, jedoch kein Uracil enthielten. Für die Gegenselektion wurden sie auf SD-Medien mit FOA (2.1.6; FOA von WAK-Chemie, Bad Soden) aufgetropft. Zur Kontrolle, dass die Zellzahlen aller Verdünnungen identisch waren, wurden dieselben Verdünnungen auf selektive SD-Festmedien mit Uracil (2.1.6) aufgetropft. Die Platten wurden bei 30°C für zwei bis fünf Tage inkubiert.

2.2.3.2 Two-Hybrid-Interaktionstest

Die pAD- und pBD-Pendelvektoren exprimieren Fusionsgene aus der *GAL4*-Aktivierungsdomäne (Codon 761-881 von *GAL4*) und *PEX4* im Falle von pAD-GAL4-2.1 und aus der *GAL4*-Bindedomäne (Codon 1-147 von *GAL4*) und *PEX4* im Falle von pBD-GAL4 Cam. Die Vektoren wurden gemeinsam in Hefezellen des Stammes Y190 transformiert, dessen *HIS3* Gen unter der Kontrolle der *GAL4* Transkriptionsaktivator-domänen steht, des weiteren als Negativkontrolle jedes Plasmid einzeln mit einem entsprechenden Leerplasmid zusammen und eine Positivkontrolle. Die Transformanten wurden auf selektive SD-Festmedien (2.1.6) ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in sterilem destillierten Wasser so verdünnt, dass sich in einem Volumen von 3,75 µl eine definierte Zellzahl befand (bei OD₆₀₀ von 1,0 etwa 10.000 Zellen). Weiter wurden Verdünnungsreihen von 1:10, 1:100 und 1:1000 (also entsprechend 1000, 100 und 10 Zellen) angelegt und die Hefen auf SD-Nährplatten aufgetropft, die auf die Anwesenheit der Plasmide selektionierten und darüber hinaus kein Histidin enthielten. Da der *GAL4*-Promotor in dieser Fusion nicht vollständig reprimiert ist, wurden den Nährmedien verschiedene Konzentrationen (0 – 50 mM) des Histidin Antimetaboliten 3'-Aminotriazol zugegeben (2.1.6). Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 30°C konnten die Wachstumsunterschiede dokumentiert werden (2.1.11).

2.2.3.3 Ölsäure-Wachstumstests

Zellen der Pex-Deletionsstämme (2.1.8), die entweder ein Plasmid mit dem entsprechenden Pex-Fusionsgen oder ein Leerplasmid trugen, sowie Zellen des Wildtyp-Stammes mit einem entsprechenden Leerplasmid wurden zunächst auf Vorbereitungsmedium für Wachstum auf Ölsäure mit 3‰ Glukose (2.1.6) umgestrichen, das auf die Anwesenheit der entsprechenden Plasmide selektionierte, und 72 Stunden bei 30°C darauf inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder einfach auf Ölsäure-Festmedien umgestrichen oder aber die Zellen wurden in sterilem destillierten Wasser so verdünnt, dass sich in einem Volumen von 3,75 µl eine definierte Zellzahl befand (bei OD₆₀₀ von 1,0 etwa 10.000 Zellen). Weiter wurden Verdünnungsreihen von 1:10, 1:100 und 1:1000 (also entsprechend 1000, 100 und 10 Zellen) angelegt und die Hefen auf Ölsäure-Festmedien (2.1.6) aufgetropft, die auf die Anwesenheit der Plasmide selektionierten. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für mindestens 7 Tage. Wachstumsunterschiede und vor allem das Auftauchen der charakteristischen klaren Höfe um die Kolonien herum zeigten Wachstumsfähigkeit auf Ölsäure an.

2.2.3.4 Mikroskopie mit Grün-Fluoreszierendem Protein

2.2.3.4.1 GFP-SKL Importversuche

Zellen der Pex-Deletionsstämmen (2.1.8), die entweder ein Plasmid mit dem entsprechenden Pex-Fusionsgen oder ein Leerplasmid trugen, sowie Zellen des Wildtyp-Stammes mit einem entsprechenden Leerplasmid wurden zusätzlich mit dem Plasmid pEW88 transformiert, das für das C-terminal mit der PTS1-Sequenz SKL fusionierte Grün Fluoreszierende Protein (GFP) kodiert. Die Transformanten wurden zunächst auf Vorbereitungsmedium für Wachstum auf Ölsäure mit 3‰ Glukose (2.1.6) umgestrichen, das auf die Anwesenheit der entsprechenden Plasmide selektionierte, und 72 Stunden bei 30°C darauf inkubiert. Anschließend wurden Zellen in 20%iger Glycerollösung resuspendiert und durch Fluoreszenzmikroskopie (2.1.10) analysiert. Dabei konnte zwischen der auf das Peroxisom konzentrierten Farbwirkung im Wildtyp und der über das gesamte Cytosol verteilten Färbung in den Deletionsstämmen die Fähigkeit der Pex-Fusionsproteine zur Rekonstitution importfähiger Peroxisomen abgeschätzt werden.

2.2.3.4.2 Interaktionstests mit dem Cub-RGFP-Modul

Hefezellen, die ein Plasmid mit einem Pex-Cub-RGFP Fusionsgen besaßen, wurden mit einem Plasmid mit dem NuI-Fusionsgen eines vermuteten oder bekannten Interaktionspartners, einer NuI-Negativkontrolle oder einem Leerplasmid kotransformiert. Die Transformanten wurden zunächst auf Vorbereitungsmedium für Wachstum auf Ölsäure mit 3‰ Glukose (2.1.6) umgestrichen, das auf die Anwesenheit der entsprechenden Plasmide selektionierte, und 72 Stunden bei 30°C darauf inkubiert. Anschließend wurden Zellen in 20%iger Glycerollösung resuspendiert und durch Fluoreszenzmikroskopie (2.1.10) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Rational der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Netzwerkes der Interaktionen von Proteinen, die mit der peroxisomalen Membran assoziiert sind. Dazu wurde jeweils ein Protein mit dem Cub-RUra3p-Modul an seinem C-Terminus modifiziert und die Interaktion mit möglichst vielen NuI-Fusionsproteinen in einem Wachstumstest von Hefezellen, die jeweils eine Nub- und das zu testende Cub-RUra3p-Fusionsprotein koexprimierten, gemessen. Die Nub- und Cub-Fusionsproteine wurden dabei in Test- und Kontrollproteine unterteilt. Testproteine waren diejenigen Proteine, deren Interaktionsnetzwerk ermittelt werden sollte. Diese Arbeit beschränkte sich dabei fast ausschließlich auf die Klasse der peroxisomalen Membranproteine, die als Peroxine bezeichnet werden. Dies erschien zum einen deswegen sinnvoll, weil die überwiegende Mehrzahl der bekannten peroxisomalen Membranproteine der Hefe dieser Klasse angehört, zum anderen, weil einfache Tests erlaubten, die Funktionalität der modifizierten Peroxine zu testen. Als Kontrollproteine wurden diejenigen Proteine bezeichnet, die helfen sollten, die Spezifität der gemessenen Interaktion zu beurteilen. Hierzu wurden Membranproteine anderer Kompartimente und ein cytosolisches Protein mit Nub modifiziert. Lagen Informationen zu den Topologien der eingesetzten Membranproteine vor, so wurde auf die Konstruktion der Nub- oder Cub-Fusionsproteine verzichtet, bei denen der entsprechende Terminus im nativen Protein in die Matrix des Peroxisoms weisen würde. Bevor die Interaktionstests beschrieben werden, sollten zunächst die Ergebnisse der Funktionalitätstests zusammengefasst werden.

3.2 Funktionalitätstests der Fusionsproteine

Für den Test auf Funktionalität der Fusionsproteine wurden WT-Zellen mit Zellen des entsprechenden Deletionsstammes verglichen, die entweder das Fusionsprotein exprimierten oder ein Leerplasmid trugen. Es wurden zwei Methoden angewendet, von denen die eine die metabolischen Funktion des Peroxisoms testete (Wachstum auf Ölsäure, 3.2.1), und die andere den Import eines peroxisomalen Matrixproteins erfasste (Import von GFP-SKL, 3.2.2).

3.2.1 Wachstum auf Ölsäure

Hefen benötigen funktionelle Peroxisomen, um auf Ölsäure wachsen zu können. Da Deletionen in Peroxinen den Zellen diese Fähigkeit rauben, die Expression des funktionellen Gens den Deletionsstämmen das Wachstum auf diesem Medium jedoch wieder ermöglicht (Erdmann *et al.*, 1989; Götte *et al.*, 1998), können die Fusionsproteine der Peroxine durch

Komplementationsexperimente in den entsprechenden Deletionsstämmen einfach getestet werden (siehe 2.2.3.3). In Abb. 3.1 sind Analysen von Pex5-Cub-RUra3p und Pex22-Cub-RUra3p im Tröpfelverfahren gezeigt, in Abb. 3.2 NuI-Pex3p und Pex12-Cub-RUra3p im Ausstrichverfahren. Pex5-Cub-RUra3p und Pex12-Cub-RUra3p ermöglichen JD53- Δ pex5- bzw. JD53- Δ pex12-Zellen dabei nicht, auf Ölsäure wachsen zu können. Die Fusionsproteine sind demnach nicht funktionell. Die mit Pex22-Cub-RUra3p komplementierten Zellen von JD53- Δ pex22 hingegen wachsen ähnlich gut auf Ölsäure wie die Zellen des Wildtyps JD53. Dieses Fusionsprotein scheint voll funktionell zu sein. NuI-Pex3p vermag zwar die Fähigkeit zum Wachstum auf Ölsäure zu vermitteln, scheint dies aber weniger gut als das unmodifizierte Protein zu erlauben (Abb. 3.2). Es wird daher angenommen, dass NuI-Pex3 nur partiell funktionell ist.

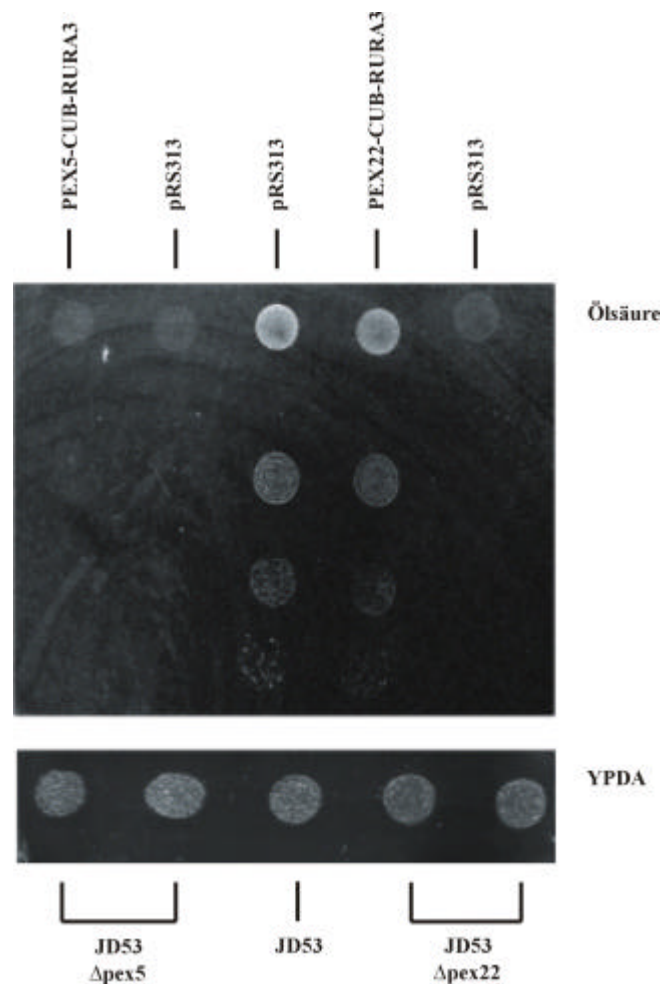


Abb. 3.1: Funktionalitätstest peroxisomaler Fusionsproteine durch Wachstum auf Ölsäure-Medien im Tröpfelverfahren. Zellen eines *pex*-Deletionsstammes wurden mit einem Leerplasmid oder mit einem das entsprechende Pex-Fusionsprotein kodierenden Plasmid transformiert und nach 48-stündiger Vorzucht auf 0,3% - Glukose-Medium auf Medien ausgebracht, die als einzige Kohlenstoffquelle ein Ölsäure-Palmitat-Gemisch besaßen und auf die Anwesenheit der Plasmide selektierten (Ölsäure-Medium ohne His, 0 μ M Met). Die Platten wurden bis zu 7 Tage lang bei 30°C inkubiert. War das Fusionsprotein funktionell, so konnte es den Wachstumsdefekt der Deletion kompensieren. Um cytotoxische Effekte auszuschließen, wurden die Zellen auch auf entsprechenden SD-Medien (nicht gezeigt) ausgestrichen und auf YPDA-Medium aufgetropft.

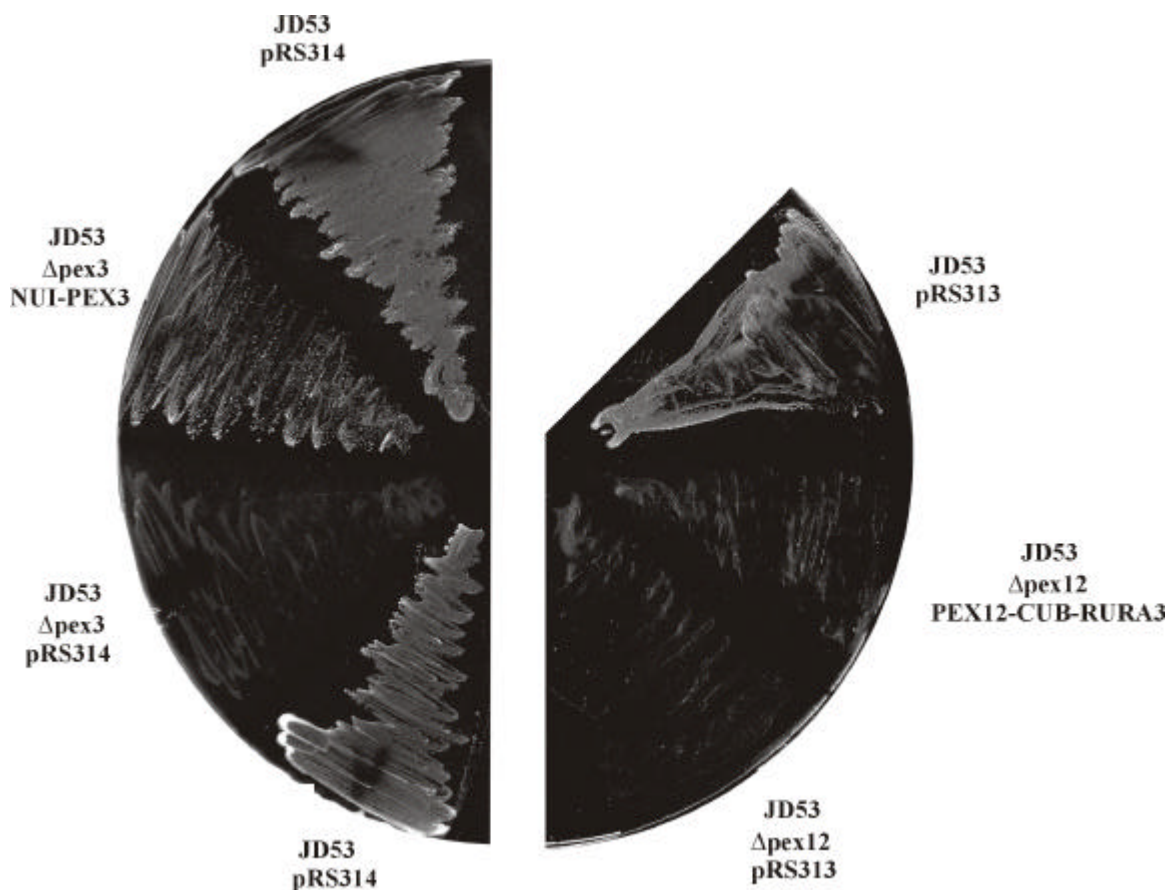


Abb. 3.2: Funktionalitätstest peroxisomaler Fusionsproteine durch Wachstum auf Ölsäure-Medien im Ausstrichverfahren. Zellen eines *pex*-Deletionsstammes wurden mit einem Leerplasmid oder mit einem das entsprechende Pex-Fusionsprotein kodierenden Plasmid transformiert und nach 48-stündiger Vorzucht auf 0,3% - Glukose-Medium auf Medien ausgebracht, die als einzige Kohlenstoffquelle ein Ölsäure-Palmitat-Gemisch besaßen und auf die Anwesenheit der Plasmide selektierten (links: Ölsäure-Medium ohne Trp, mit 100 μ M CuSO_4 ; rechts Ölsäure-Medium ohne His, 0 μ M Met). Die Platten wurden bis zu 7 Tage lang bei 30°C inkubiert. War das Fusionsprotein funktionell, so konnte es den Effekt der Deletion kompensieren. Um cytotoxische Effekte auszuschließen, wurden die Zellen auch auf entsprechenden SD-Medien ausgestrichen (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse des Wachstumstests sind in Tab. 3.1 zusammengefasst:

NuI-Pex1	-	NuI-Pex13	(+)	Pex5-Cub-Rura3p	-
NuI-Pex3	(+)	NuI-Pex14	-	Pex10-Cub-RUra3p	(+)
NuI-Pex4	+	NuI-Pex15	(+)/+	Pex11-Cub-RUra3p	+
NuI-Pex5	-	NuI-Pex19	+	Pex12-Cub-RUra3p	-
NuI-Pex10	+	Pex22-NuI	(+)	Pex13-Cub-RUra3p	-
NuI-Pex11	+	Pex2-Cub-RUra3p	(+)	Pex14-Cub-RUra3p	-
NuI-Pex12	(+)	Pex3-Cub-RUra3p	+	Pex17-Cub-RUra3p	+
Pex12-NuI	-	Pex4-Cub-RUra3p	(+)	Pex22-Cub-RUra3p	+

Tab. 3.1: Funktionalitätstest peroxisomaler Fusionsproteine durch Wachstum auf Ölsäure-Medien.

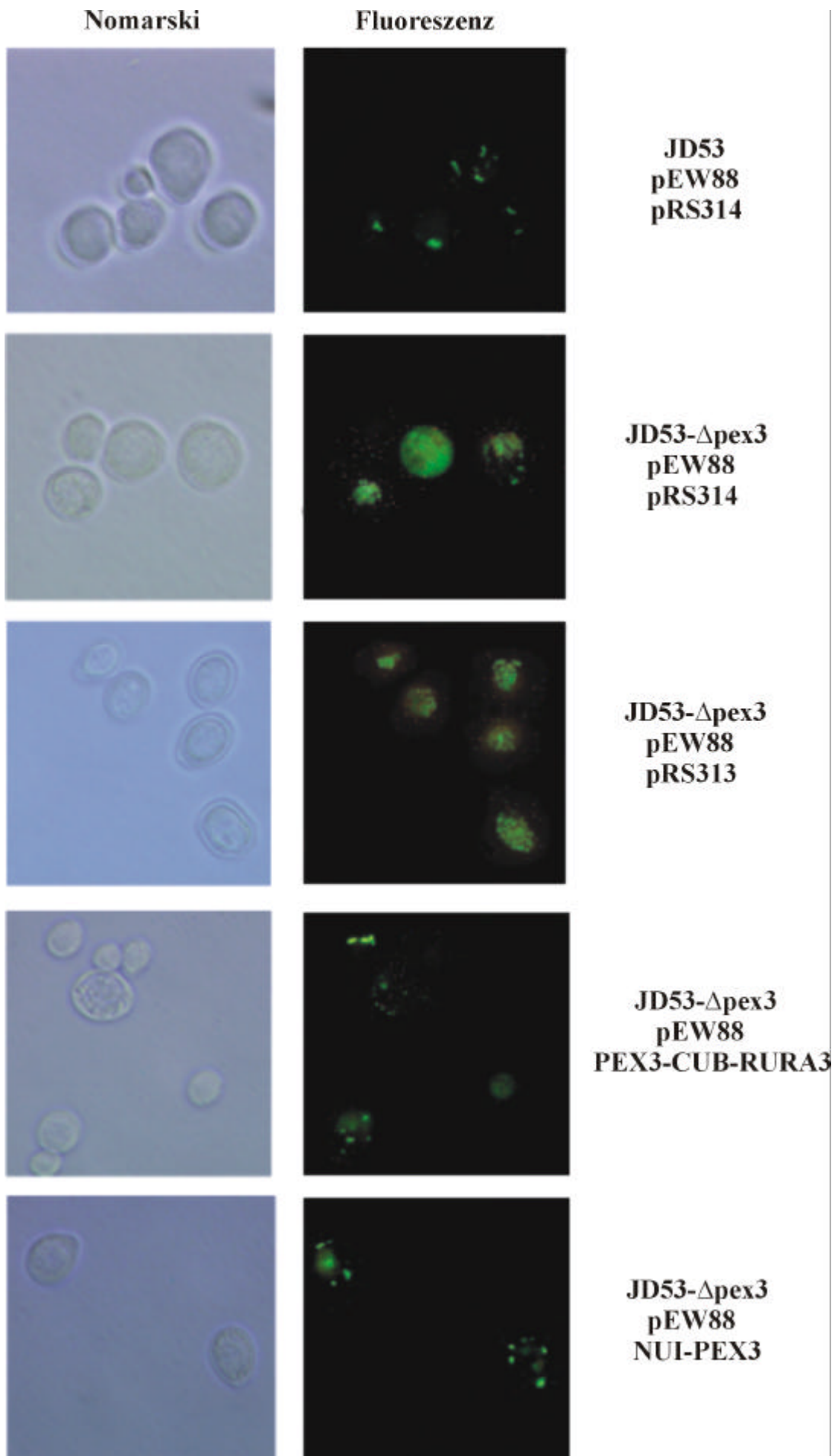
Die Fähigkeit der genannten Fusionsproteine, in Δpex -Zellen den Verlust der korrespondierenden *PEX*-Gene bezüglich der Fähigkeit zum Wachstum auf Ölsäure auszugleichen, wurde getestet. Die Fusionsproteine wurden daraufhin als „funktionell“ (+), „partiell funktionell“ ((+)) oder „nicht funktionell“ (-) klassifiziert.

3.2.2 Import von GFP-SKL

Hettema *et al.* (2000) beschrieben, dass ein Fusionsprotein aus dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) und dem SKL-Tripeptid (PTS1) sehr effektiv ins Peroxisom importiert wird. In diesem Falle ist das Organell deutlich durch die grüne Fluoreszenz gekennzeichnet. In Zellen ohne funktionellen peroxisomalen Import hingegen verteilt sich das GFP-SKL im gesamten Cytosol, so dass in der Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Zelle aufleuchtet. JD53-Zellen und Zellen aller Deletionsstämme wurden daher mit dem das GFP-SKL exprimierenden Plasmid pEW88 (Ewald Hettema und Ben Distel, Amsterdam) transformiert. Zusätzlich wurden Leerplasmide oder die für die Pex-Fusionsproteine kodierenden Plasmide kotransformiert. Kam es zu keiner Komplementation, wurden die Fusionsproteine als „nicht funktionell“ klassifiziert. Zeigten etwa 90% der Zellen fluoreszierende Peroxisomen (entsprechend den Wildtyp-Zellen), so wurden die Fusionsproteine als „funktionell“ bezeichnet. Als „teilweise funktionell“ wurden die Fusionsproteine eingestuft, die bei einer geringeren Zahl von Zellen eine Rekonstitution des Imports ermöglichten oder in denen noch immer eine Restfluoreszenz des Cytosols zu beobachten war. Abb. 3.3 zeigt die Untersuchungen an den Pex3-Fusionsproteinen NuI-Pex3 und Pex3-Cub-RUra3p. Die farblichen Abweichungen der Aufnahmen in der Nomarski-Optik sind Produkte der Anpassung von Kontrast und Helligkeit, um die optimale Auflösung zu erzielen und reflektieren nicht methodische Unterschiede. Auch die vereinzelt in den Fluoreszenzaufnahmen auftretenden roten Punktierungen sind Ergebnisse der Kontrastbearbeitung. Deutlich sichtbar ist der Verlust der Importkompetenz in den JD53- $\Delta pex3$ -Zellen, die nur die Leerplasmide pRS313 oder pRS314 tragen gegenüber den WT-Zellen. Wird Pex3-Cub-RUra3p in solchen Zellen exprimiert, so weist eine größere Zahl von ihnen wieder SKL-vermittelte Importtätigkeit auf. Wird NuI-Pex3 in den Zellen exprimiert, so wird ein den WT-Zellen vergleichbarer Anteil an SKL-importierenden Zellen erreicht.

Abb. 3.3: Analyse der Funktionalität von Pex-Fusionsproteinen durch GFP-SKL-Import.

Zellen eines *pex*-Deletionsstammes und von JD53 (WT) wurden zunächst mit einem das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) mit C-terminaler SKL-Sequenz exprimierenden Plasmid transformiert und dann entweder mit einem Leerplasmid oder mit einem das entsprechende Pex-Fusionsprotein kodierenden Plasmid kotransformiert. Nach 48-stündiger Anzucht auf 0,3% -Glukose-Medium, das auf die Anwesenheit der Plasmide selektierte und maximale Expression durch 0 μ M Met bzw. 100 μ M CuSO_4 stimulierte, wurden die Zellen in 20% Glycerol suspendiert und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. War das Fusionsprotein funktionell, so konnte es den Effekt der Deletion kompensieren und den Import von GFP-SKL ins Peroxisom rekonstituieren. Um cytotoxische Effekte auszuschließen, wurden die Zellen auch auf entsprechenden SD-Medien ausgestrichen (nicht gezeigt).



Die Ergebnisse dieses GFP-SKL-Import-Versuches sind in Tab. 3.2 zusammengefasst:

NuI-Pex1	-	NuI-Pex13	(+)	Pex5-Cub-RUra3p	-
NuI-Pex3	+	NuI-Pex14	-	Pex10-Cub-RUra3p	(+)
NuI-Pex4	(+)	NuI-Pex15	+	Pex11-Cub-RUra3p	+
NuI-Pex5	-	NuI-Pex19	+	Pex12-Cub-RUra3p	-
NuI-Pex10	(+)	Pex22-NuI	(+)	Pex13-Cub-RUra3p	-
NuI-Pex11	+	Pex2-Cub-RUra3p	(+)	Pex14-Cub-RUra3p	-(+)
NuI-Pex12	-(+)	Pex3-Cub-RUra3p	(+)	Pex17-Cub-RUra3p	(+)
Pex12-NuI	-	Pex4-Cub-RUra3p	(+)	Pex22-Cub-RUra3p	+

Tab. 3.2: Funktionalitätstest peroxisomaler Fusionsproteine durch GFP-SKL-Import-Versuch.

Die Fähigkeit der genannten Fusionsproteine, den Import von GFP-SKL in den korrespondierenden Δpex -Zellen wiederherzustellen, wurde getestet. Die Fusionsproteine wurden daraufhin als „funktionell“ (+), „partiell funktionell“ ((+)) oder „nicht funktionell“ (-) klassifiziert.

Auffällig ist, dass zwar die „nicht funktionellen“ Fusionsproteine in beiden Verfahren gleichermaßen identifiziert werden konnten, jedoch in mehreren Fällen die Bewertung zwischen „funktionell“ und „partiell funktionell“ variiert, und zwar in beide Richtungen. Möglicherweise manifestieren sich die Einschränkungen partieller Funktionalität je nach Testverfahren in unterschiedlichem Maße.

3.2.3 Funktionalität und Lokalisation der Kontrollproteine

Tab. 3.3 gibt eine Übersicht über Lokalisation und Funktionalität der in dieser Arbeit verwendeten Nub-Kontrollproteine:

<u>Fusionsprotein</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Funktionalität</u>
NuI-Guk1	Cytosol	ja (Raquet <i>et al.</i> , 2001)
NuI-Sec22	Endoplasmatisches Retikulum	ja (H. J. Schmidt, Göttingen)
NuI-Snc1	Golgi / Plasmamembran	nicht getestet
NuI-Ste14	Endoplasmatisches Retikulum	ja (Wittke <i>et al.</i> , 1999)
NuI-Tom22	Mitochondrium	nicht getestet
NuI-Vam3	Vakuole	nicht getestet

Tab. 3.3: Lokalisation und Funktionalität der in dieser Arbeit verwendeten Nub-Kontrollproteine.

3.3 Erstellung der Split-Ub-Interaktionskarte der Peroxine

Wildtyp-Zellen wurden mit je zwei Plasmiden, von denen eines für ein Cub-RUra3p-Fusionsprotein und das andere für ein NuI-Fusionsprotein kodierte, kotransformiert. Die Expression des Cub-RUra3p-Fusionsproteins wurde stets vom *MET17*-Promotor, die des Nub-Fusionsproteins vom *CUP1*-Promotor reguliert. Gleiche Zellzahlen verschiedener Kotransformanten wurden auf SD-Medien mit und ohne Uracil sowie auf FOA-Medien in vier verschiedenen Verdünnungen aufgetropft. Die Platten enthielten jeweils 100 μM CuSO_4 zur Stimulation der Expression der Nub-Fusionsproteine. Die Konzentration von Methionin in den Medien wurde hingegen variiert, um das Cub-RUra3p-Fusionsprotein in einer Konzentration zu exprimieren, die das größtmögliche Maß an Differenzierung erlaubte. Im Folgenden gezeigt werden jeweils die Experimente, die zwischen den Interaktionen der verschiedenen Nub-Fusionsproteine die beste Differenzierung reproduzierbar zuließen.

3.3.1 Untersuchungen an putativen Komponenten des Translokons - Pex12p

3.3.1.1 Pex12-Cub-RUra3p

Pex12p wird als putative Komponente des eigentlichen Translokationskanals diskutiert (Dodt *et al.*, 1996; Holroyd und Erdmann, 2001). Pex12p ist somit eine zentrale Komponente der peroxisomalen Importmaschinerie und war ein guter Ausgangspunkt für die Erstellung des Interaktionsnetzwerkes. Es wurden also zunächst die Interaktionen von Pex12p mit Hilfe des Split-Ub-Systems untersucht. Da zunächst nur Berichte vorlagen, in denen beide Termini von Pex12p im Cytosol beobachtet worden waren (Kalish *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Okumoto und Fujiki, 1997; Okumoto *et al.*, 1998), wurden ein NUI-PEX12- sowie ein PEX12-CUB-RURA3-Fusionsgen dargestellt. Um einem späteren Bericht aus *S. cerevisiae* Rechnung zu tragen, der den N-Terminus auf der Matrixseite des Peroxisoms lokalisierte (siehe auch Albertini *et al.*, 2001), wurde später auch eine C-terminale Nub-Fusion von Pex12p (Pex12-NuI) erstellt (Abb. 3.4).

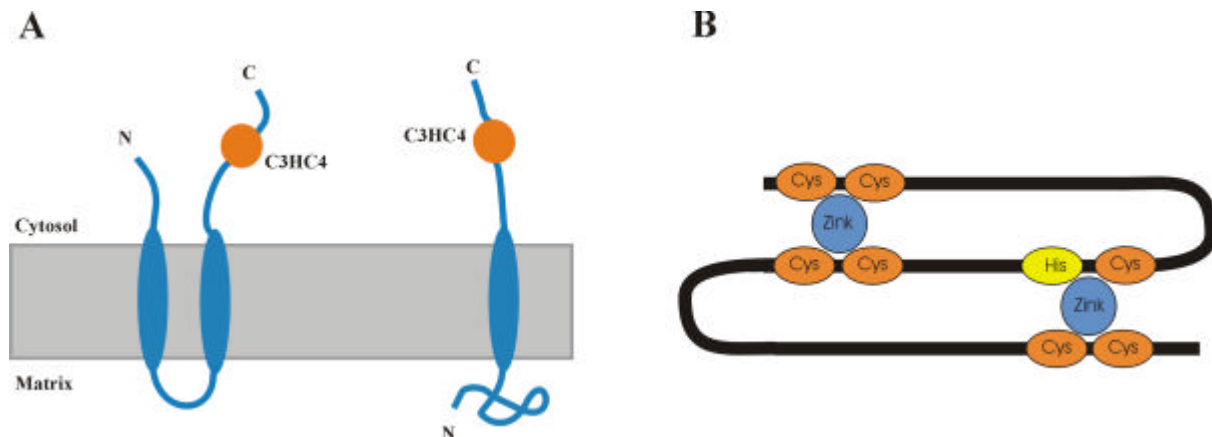


Abb. 3.4: Übersicht über die Topologie von Pex12p und das C3HC4 Zink-Finger-Motiv.

(A) Das Protein Pex12p besitzt mindestens eine, oder je nach Analyse und Herkunft des Pex12p zwei Transmembrandomänen (TMD). In *S. cerevisiae* wurde kürzlich der N-Terminus auf der Matrixseite der Membran lokalisiert. Es ergeben sich somit zwei mögliche Topologien. (B) Modell eines Zink-Ring-Fingers. Auch Pex12p besitzt an seinem C-terminalen Ende eine cysteinreiche Region, die Ähnlichkeit zu den bekannten C3HC4 Zink-Finger Domänen besitzt. Das C3HC4-Modul vermittelt oft Protein-Protein Interaktionen.

In Abb. 3.5 sind JD-53-Zellen gezeigt, die neben Pex12-Cub-RUra3p jeweils eines der 22 getesteten NuI-Fusionsproteine exprimieren. Dabei handelt es sich um 13 NuI-Peroxisom-Fusionsproteine (NuI-Pex1, -Pex3, -Pex4, -Pex5, -Pex10, -Pex11, -Pex12, -Pex13, -Pex14, -Pex15 und -Pex19 sowie Pex12-NuI und Pex22-NuI), zwei mit NuI fusionierte artifizielle peroxisomale Importsubstrate (NuI-SKL und NuI-SSS), sechs NuI-Fusionen mit Proteinen aus anderen Kompartimenten (ER: NuI-Ste14 und NuI-Sec22, Golgi: NuI-Snc1, Mitochondrium: NuI-Tom22, Vakuole: NuI-Vam3, Cytosol: NuI-Guk1) sowie ein Leerplasmid (pRS314). Die Zellen waren auf Uracil-haltigem Medium gezogen, dann in destilliertem sterilem Wasser suspendiert, die optische Dichte angeglichen und gleiche Volumina auf die Festmedien aufgetropft worden. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C inkubiert und schließlich dokumentiert. Auf SD-Medium, das nur auf die Anwesenheit der Plasmide selektiert (SD His⁻ Trp⁻), wachsen alle Transformanten gleich gut, so dass man cytotoxische Effekte einzelner Fusionsproteine ausschließen kann. Gleichzeitig dient dieses Ausplattieren auf Uracil-haltigem Medium (Abb. 3.5, unteres Bild) auch der Kontrolle, dass von jeder Transformante ähnliche Zellzahlen aufgetropft worden sind. Unterschiedliches Wachstumsverhalten resultiert somit direkt aus der Menge an Ura3p, das als ungespaltenes Pex12-Cub-RUra3p zur Verfügung steht. Wird es in Folge der Reassoziaton von Nub und Cub abgespalten, so erfolgt ein rascher Abbau und den Zellen steht kein Ura3p mehr zur Verfügung. Durch Expression identischer Fusionsgenpaarungen in JD55-Zellen, denen das für den Abbau des abgespaltenen RUra3p erforderliche Genprodukt von *UBR1* fehlt, konnte die direkte Abhängigkeit des Wachstumsvermögens auf Uracil-freiem Medium von der Rate der Abspaltungen belegt werden (Abb. 3.6).

Im Wachstumstest auf Uracil-freiem Medium (Abb. 3.5, oberes Bild) wird deutlich, dass durch die Wahl der Methioninkonzentration (12,5 µM) ein Expressionsniveau des Pex12-Cub-RUra3p erreicht wird, bei dem Zellen, die die NuI-Kontrollproteine aus anderen Kompartimenten koexprimieren, sowie die, die das Leerplasmid tragen, gutes Wachstum aufweisen. Eine Ausnahme macht dabei das Kontrollprotein des Mitochondriums NuI-Tom22, das zu einem leichten Interaktionssignal mit Pex12-Cub-RUra3p in Form verringerten Wachstums der Zellen führt. Dies könnte auf eine partielle Fehllokalisierung von

Pex12-Cub-RUra3p zum Mitochondrium hinweisen. Deutliche Interaktionssignale weisen dagegen die Proteine NuI-Pex13, NuI-Pex15 und NuI-Pex19 auf. Auch NuI-Pex10 zeigt ein starkes Interaktionssignal, während die übrigen Peroxine sich in zwei Klassen unterteilen lassen:

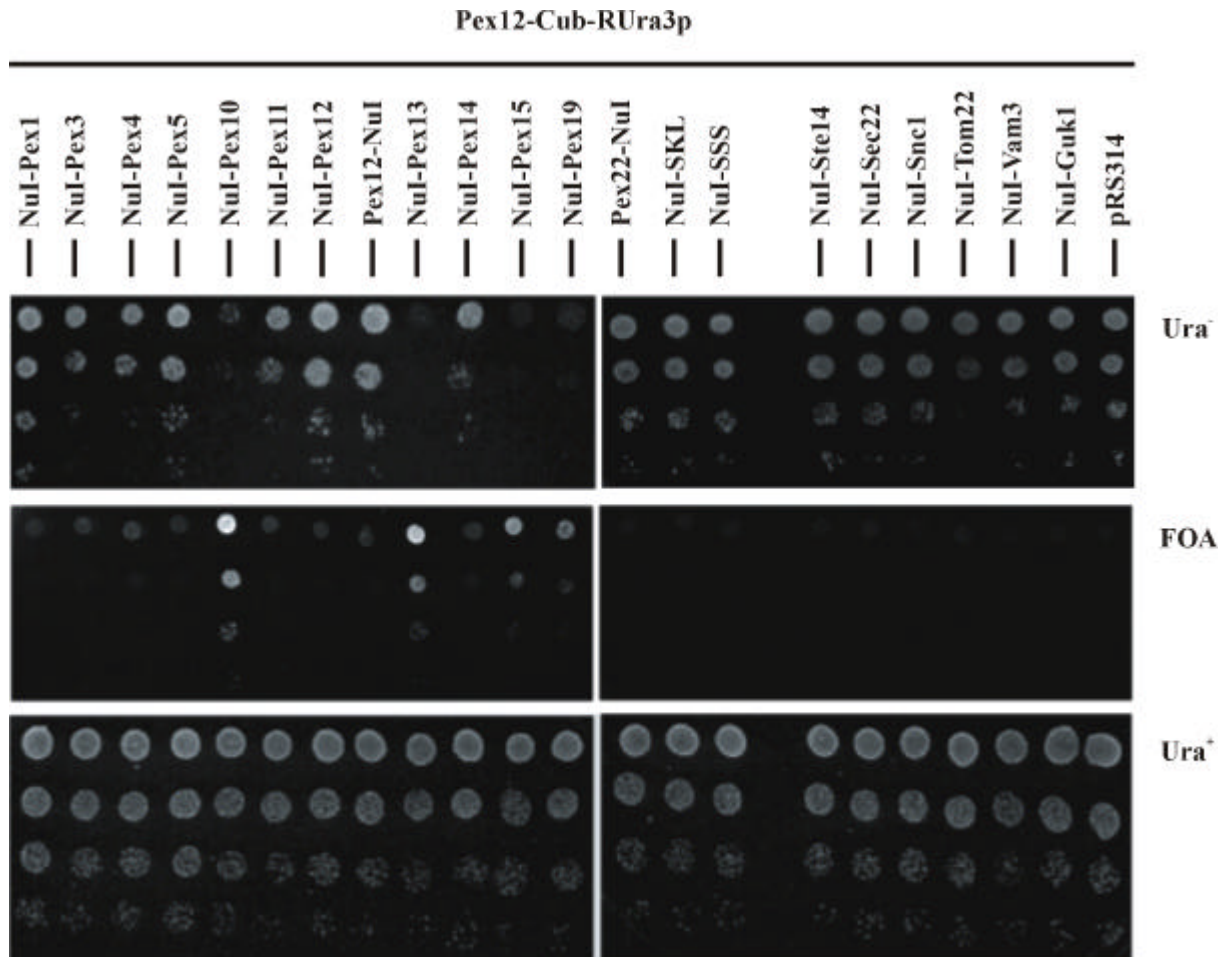


Abb. 3.5: Pex12-Cub-RUra3p interagiert im Wachstumstest mit mehreren Peroxin-Fusionsproteinen. Zellen von JD53, die Pex12-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium 12,5 µM Met (obere Reihe), SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium 12,5 µM Met (mittlere Reihe) oder SD His⁻ Trp⁻-Medium 0 µM Met (untere Reihe) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 µM CuSO₄ und wurden zwei (Ura⁻ und Ura⁺) bzw. 3 Tage (FOA) bei 30°C inkubiert.

Die eine Klasse zeigt ein Wachstumsverhalten, das von den Kontrollproteinen anderer Kompartimente nicht zu unterscheiden ist. Diese beinhaltet NuI-Pex1, NuI-Pex5, NuI-Pex12, Pex12-NuI und Pex22-NuI. NuI-Pex1 und NuI-Pex5 sind homolog ins Genom integrierte Konstrukte und könnten somit etwas von den anderen NuI-Peroxin-Fusionen abweichend exprimiert werden. Pex22-NuI und Pex12-NuI waren C-terminale Fusionen von Nub und den jeweiligen Proteinen, mit deren (vermuteter) Lokalisation der N-Termini beider Proteine im Inneren des Peroxisoms Rechnung getragen werden sollte. Allerdings zeigte sich im Laufe

dieser Arbeit, dass sein C-terminal fusioniertes Nub weniger gut mit Cub zu interagieren in der Lage ist als ein N-terminal fusioniertes Nub. Hier ist möglicherweise ein weniger funktionsfähiges oder unzugänglicheres Nub-Modul entstanden. Die zweite Klasse umfasst diejenigen NuI-Proteine, die zwar stärker interagieren als die neutralen Kontrollproteine, aber immer noch Wachstum auf Uracil-freiem Medium zulassen (NuI-Pex3, -Pex4, -Pex11). Dieses Signal bedeutet sehr wahrscheinlich eine Kollokalisierung mit Pex12-Cub-RUra3p im selben Kompartiment.

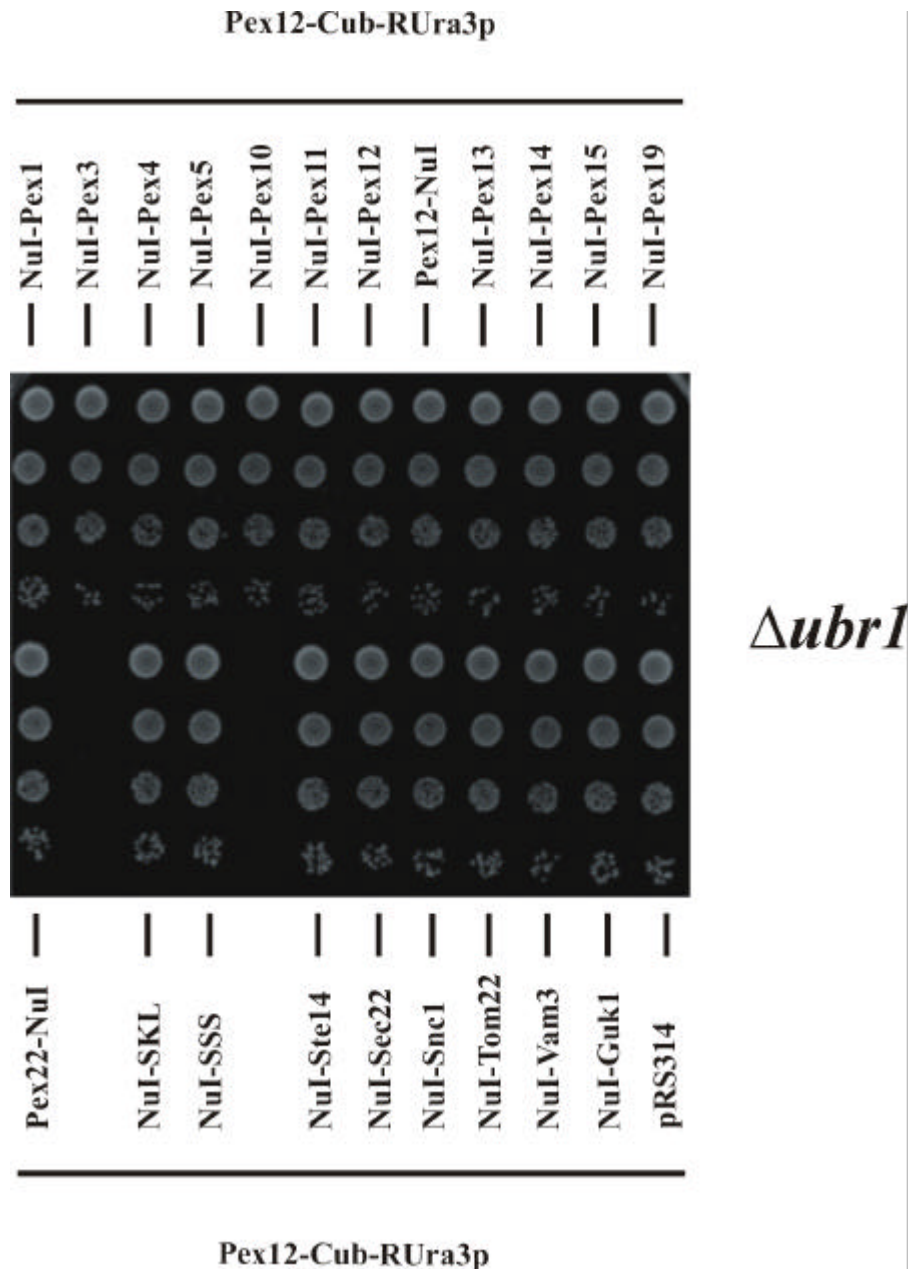


Abb. 3.6: Das Kontrollexperiment in JD55-Zellen (*Δubr1*) belegt, dass der Wachstumstest spezifisch von der Abspaltung des RUra3p abhängig ist. Zellen von JD55 (*Δubr1*-Zellen), die Pex12-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium 0 μM Met aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Das FOA-Experiment (Abb. 3.5, mittleres Bild) bestätigt und verdeutlicht die durch den Ura⁻-Test gewonnenen Informationen. Nur für NuI-Pex10, -Pex13, -Pex15 und -Pex19 wird ein Interaktionssignal, diesmal in Form von Wachstum der Zellen, gemessen. Die Methode beruht auf dem gleichzeitigen Angebot von Uracil und 5'-Fluor-Orothsäure (FOA). Letzteres ist ein Analogon der Orothsäure, die von Ura3p zu Uridylat umgesetzt wird. Stellen die transformierten Zellen ausreichend ungeschnittenes Cub-RUra3p-Fusionsprotein her, so wird aus FOA das toxische 5'-Fluorouracil synthetisiert und die Zellen sterben. Kommt es hingegen zu einer starken Interaktion zwischen NuI- und Cub-RUra3p-Fusionsprotein, so steht in Folge von Spaltung und Abbau nicht genug Ura3p zur Verfügung, um toxische Mengen von 5'-Fluorouracil herzustellen. Im Laufe dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die Intensität der Signale in FOA und Ura⁻-Test nicht immer spiegelbildlich ist. Grundsätzlich ist aber die Trennung zwischen interagierenden NuI-Peroxinen und nicht interagierenden NuI-Peroxinen im FOA-Test eindeutiger als auf den SD Ura⁻-Platten. Oft werden daher nur noch die FOA-Ergebnisse gezeigt, sofern nicht durch die Bilder des Ura⁻-Tests wesentliche zusätzliche Informationen gewonnen wurden.

3.3.1.2 Charakterisierung der Bindungsdomänen von Pex12p

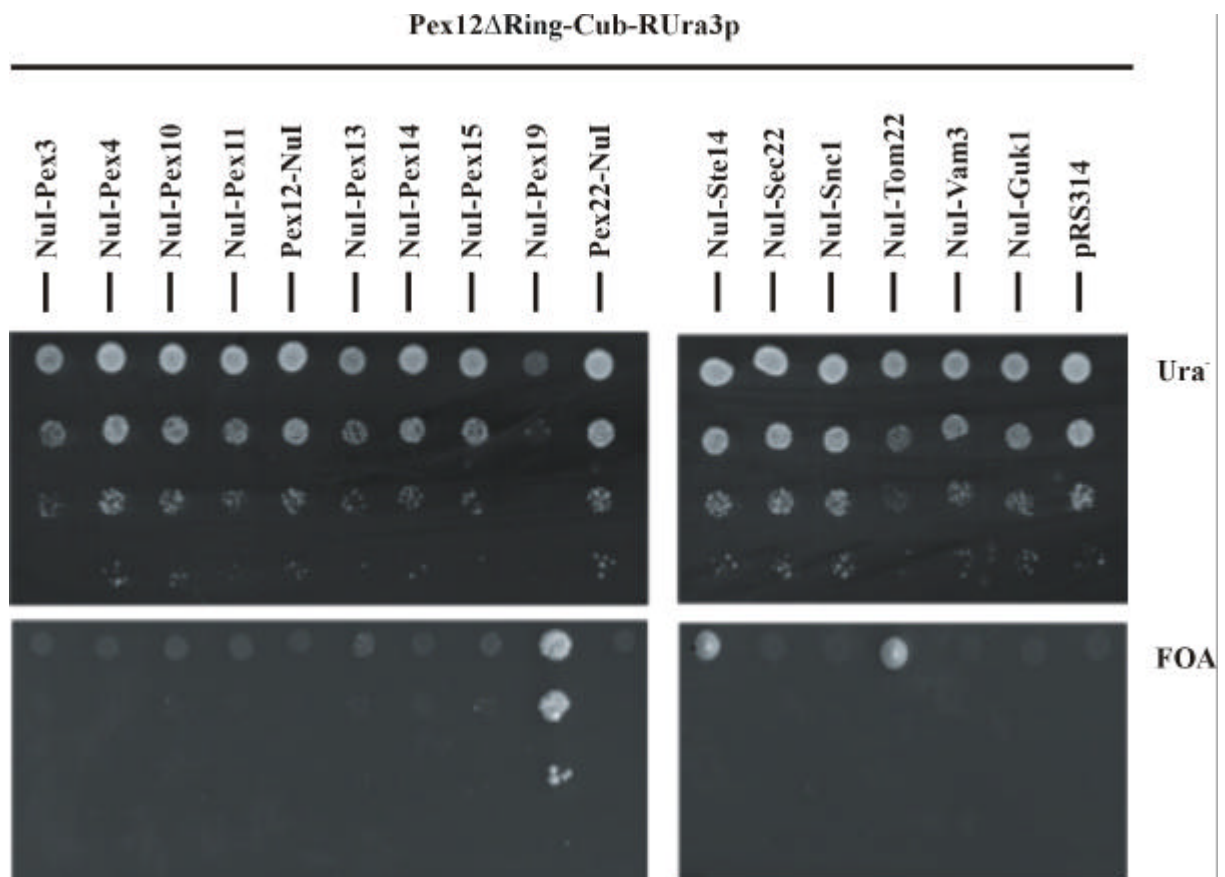


Abb. 3.7: Durch Deletion der Zink-Finger-Domäne von Pex12p (Pex12 Δ Ring-Cub-RUra3p) gehen die Interaktionen mit NuI-Pex10, -Pex13 und -Pex15 verloren.

Wildtypzellen (JD53), die Pex12 Δ Ring-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium 0 μ M Met und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium 0 μ M Met aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Während die Nähe zwischen Pex15p und Pex12p noch nicht beschrieben worden ist, wurde die Interaktion zwischen Pex12p und Pex13p kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit mit anderen Methoden demonstriert (Albertini *et al.*, 2001; Reguenga *et al.*, 2001). Um die Spezifität der gemessenen Interaktionen zu überprüfen, wurde versucht, eine Mutante von Pex12p darzustellen, die zwar im Peroxisom lokalisiert ist, jedoch nicht mehr mit den übrigen Peroxinen interagieren kann. Da die Zink-Ring-Domäne einen besonders wahrscheinlichen Bindungsort darstellt, wurde zunächst ein Pex12-Cub-RUra3p-Fusionsprotein erstellt, dem diese Ringdomäne fehlt (Pex12 Δ Ring-Cub-RUra3p) und dessen Interaktion mit den NuI-Fusionsproteinen gemessen. In Abb. 3.7 wird aus FOA- wie Ura⁻-Test deutlich, dass nach der Deletion der Ringdomäne nur noch NuI-Pex19 an das Restprotein Pex12 Δ Ring-Cub-RUra3p bindet. Es ist hieraus zu schließen, dass die Zink-Ring-Domäne von Pex12p eine Voraussetzung für die Interaktionen mit Pex10p, Pex13p und Pex15p ist. Weiterhin ist im Wachstumstest auf SD Ura⁻ ein nicht sehr starker, aber doch erkennbarer Einbruch im Wachstumsvermögen für die Transformante mit NuI-Tom22 zu beobachten. Es kann daraus geschlossen werden, dass das verkürzte Protein teilweise in die mitochondriale Membran fehllokalisiert wird.

Ist die Ringdomäne von Pex12p alleine für die Bindung an die anderen Peroxine verantwortlich, so sollte ein Konstrukt, in dem diese Domäne an Cub-RUra3p fusioniert ist, ein ähnliches Interaktionsmuster wie das komplette Protein zeigen. Dies trifft jedoch nicht zu. In Abb. 3.8 wird deutlich, dass keines der NuI-Peroxine mit dem Fusionsprotein der Ringdomäne interagiert. Statt dessen zeigt NuI-Guk1 sowohl im FOA- wie Ura⁻-Test eine schwache Interaktion. Es kann hieraus geschlossen werden, dass das Fusionsprotein, das von Pex12p nur die Ringdomäne beinhaltet, nicht zur peroxisomalen Membran rekrutiert werden kann. Hierfür spricht auch, dass die Interaktion mit NuI-Pex19, das ebenfalls überwiegend cytosolisch ist und dessen Rolle vermutlich in der Rekrutierung der PMP zur Membran des Peroxisoms besteht, nicht detektierbar ist.

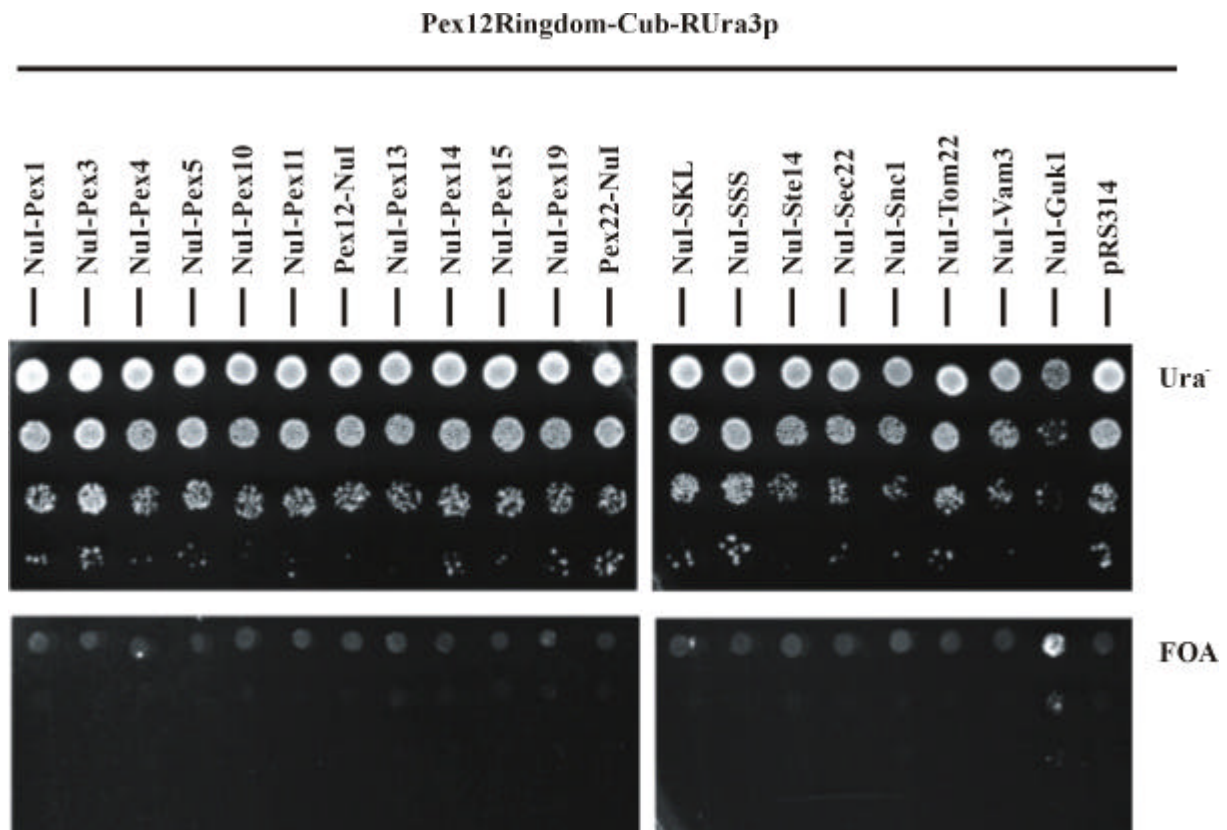


Abb. 3.8: Das Fusionsprotein der Zink-Finger-Domäne von Pex12p (Pex12Ringdom-Cub-RURA3p) kann mit keinem NuI-Peroxin interagieren und ist vermutlich im Cytosol lokalisiert.

Zellen von JD53, die Pex12Ringdom-Cub-RURA3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻ Medium 12,5 μ M Met und SD FOA His⁻ Trp⁻ Medium 25 μ M Met aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻ Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

3.3.1.3 Das Bindungsverhalten von Pex12-Cub-RUra3p in *pex*-Deletionsstämmen

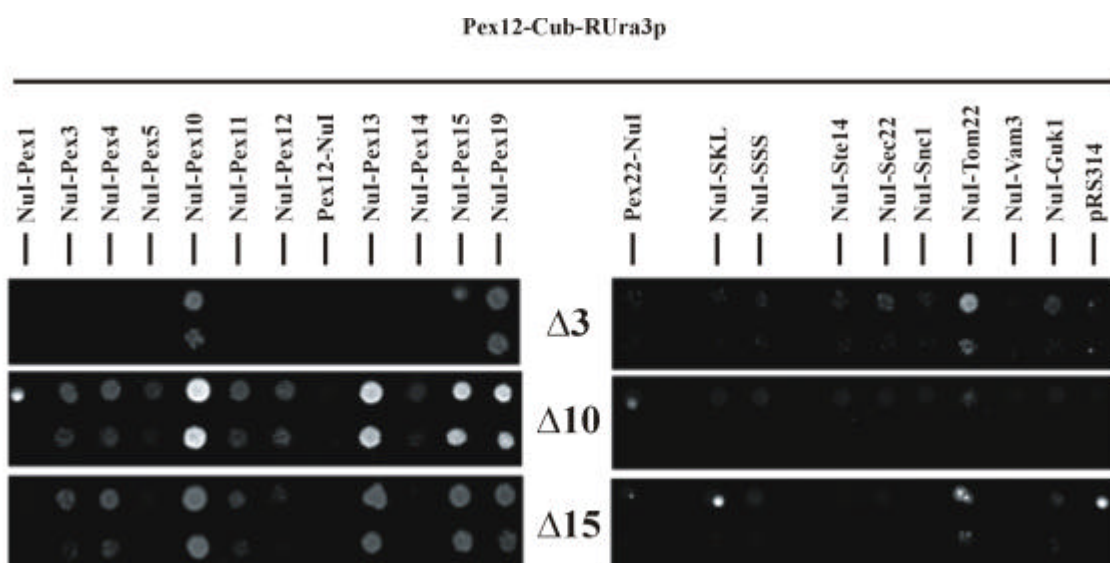


Abb. 3.9: Die Interaktionen von Pex12-Cub-RUra3p mit NuI-Pex10 und NuI-Pex19 sind nicht von Pex3p oder Pex15p abhängig.

Zellen von JD53- Δ pex3 (Δ 3), JD53- Δ pex10 (Δ 10) oder JD53- Δ pex15 (Δ 15), die Pex12-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium 0 μ M Met und SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium 0 μ M Met (nicht gezeigt) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Eine weitere interessante Fragestellung zum Bindungsverhalten von Pex12-Cub-RUra3p war, inwieweit die Interaktionen mit den jeweiligen NuI-Peroxin-Fusionsproteinen von anderen Peroxinen abhängen. Es wurden daher alle NuI-Substrate mit Pex12-Cub-RUra3p in den Stämmen JD53- Δ pex3, JD53- Δ pex10 und JD53- Δ pex15 koexprimiert. Da Δ pex3-Zellen keine peroxisomalen Membranen bilden (Höhfeld *et al.*, 1991; Ghaedi *et al.*, 2000), kann durch die Messung in diesem zellulären Hintergrund ermittelt werden, ob die peroxisomale Membran für die jeweilige Interaktion von Pex12p überhaupt erforderlich ist. Im Deletionsstamm JD53- Δ pex3 können nur noch zwei der vier Interaktionen mit Peroxinen beobachtet werden. Während NuI-Pex10 und NuI-Pex19 weiterhin mit Pex12-Cub-RUra3p in Wechselwirkung treten, sind die Interaktionen mit NuI-Pex13 und NuI-Pex15 nicht mehr messbar. Gleichzeitig ist festzustellen, dass vor allem in JD53- Δ pex3, aber auch in den anderen Stämmen die Reaktionsstärke mit NuI-Tom22 im Vergleich zum WT deutlich zunimmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Δ pex3-Zellen sind die Interaktionen zwischen Pex12-Cub-RUra3p und den Substraten NuI-Pex10, NuI-Pex13, NuI-Pex15 und NuI-Pex19 in den Deletionsstämmen JD53- Δ pex10 und JD53- Δ pex15 weiterhin zu beobachten (Abb. 3.9). So kann davon ausgegangen werden, dass weder Pex10p noch Pex15p für diese Interaktionen notwendig sind oder diese Bindungen indirekt vermitteln. Zugleich ist zu beobachten, dass die Stabilität des Cub-RUra3p-Fusionsproteins in den Deletionsstämmen abnimmt, und zwar interessanter Weise in JD53- Δ pex10 und JD53- Δ pex15 in höherem Maße als in JD53- Δ pex3, wie die stärkeren Hintergrundsignale bei etlichen NuI-Peroxin-Fusionen verdeutlichen, die nicht im Wildtyp messbar sind (Abb. 3.9). Reduzierte Stabilität von Peroxin-Fusionsproteinen in Δ pex-Zellen werden auch im Western Blot beobachtet (vgl. 3.4.1.2 und Abb. 3.22).

Abb. 3.10: Schematische Zusammenfassung der für Pex12-Cub-RUra3p beobachteten Interaktionen mit anderen Peroxinen. Von der hervorgehobenen Interaktion zwischen NuI-Pex10p und Pex12-Cub-RUra3p ausgehend wurde nun Pex10-Cub-RUra3p analysiert.

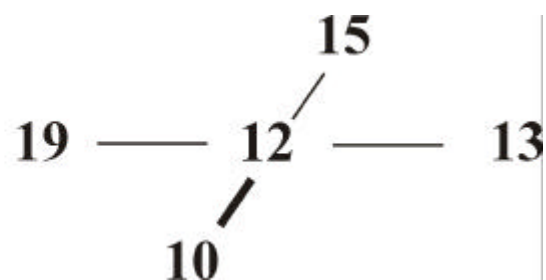


Abbildung 3.10 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit schematisch zusammen. Da der C-Terminus von Pex15p ins Lumen des Peroxisoms weist und Pex19p an seinem C-Terminus posttranslational farnesyliert wird, können von beiden Proteinen keine sinnvollen Cub-RUra3p-Fusionsproteine erstellt werden. Die Erstellung des Interaktionsnetzwerkes wurde daher mit der Messung der Interaktionen von Pex10-Cub-RUra3p fortgesetzt.

3.3.2 Pex10p

3.3.2.1 Pex10-Cub-RUra3p

Das Peroxin Pex10p besteht aus 337 Aminosäuren, besitzt wie Pex12p einen der typischen

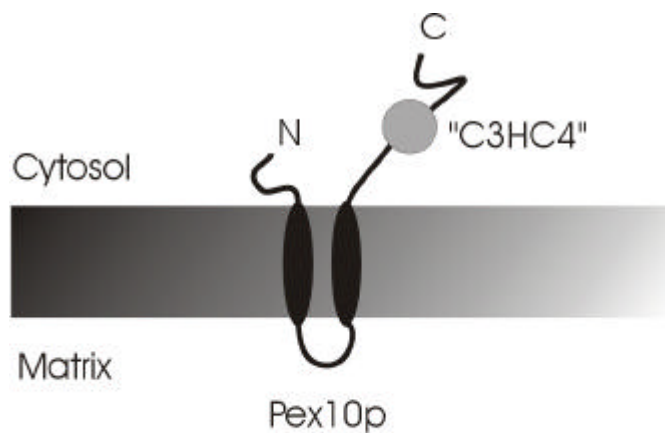


Abb. 3.11: Orientierung von Pex10p in der peroxisomalen Membran. Beide Termini sowie die der C3HC4 Zink-Finger-Domäne ähnliche Region befinden sich im Cytosol. Pex10p besitzt zwei Transmembrandomänen (TMD).

C3HC4-Ring-Finger-Domäne ähnlichen Sequenzabschnitt am C-Terminus des Proteins sowie zwei Transmembrandomänen (Abb. 3.11). Daher wurden sowohl ein NUI-PEX10 als auch ein PEX10-CUB-RURA3 dargestellt. Beide Fusionsproteine sind zumindest partiell funktionell. Im Wachstumstest interagieren sowohl auf SD-Ura⁻-Medium wie auch FOA-Medium die Fusionsproteine NuI-Pex4, NuI-Pex10, NuI-Pex13, NuI-Pex15 und NuI-Pex19

deutlich mit Pex10-Cub-RUra3p (Abb. 3.12). Im FOA-Test gibt es darüber hinaus ein schwaches Interaktionssignal von Zellen, die NuI-Tom22 mit Pex10-Cub-RUra3p koexprimieren. Es steht also zu vermuten, dass ähnlich wie für Pex12-Cub-RUra3p ein Teil des Cub-RUra3p-Fusionsproteins in der Zelle zum Mitochondrium fehllokalisiert wird. Allerdings sind die Interaktionen ähnlich schwach wie die Signale, die von NuI-Pex3 bzw. NuI-Pex11 generiert werden und darüber hinaus nicht im Ura⁻-Wachstumstest sichtbar. Neben der unerwarteten Interaktion mit NuI-Pex4 und NuI-Pex15 überraschte auch die Interaktion von Pex10-Cub-RUra3p mit NuI-Pex10, die entweder auf eine direkte Interaktion beider Proteine oder auf eine hohe lokale Konzentration infolge einer Akkumulation der an der Translokation beteiligten Proteine in einer bestimmten Membranregion zurückgeführt werden konnte. Diese Frage wird im Fortgang dieser Arbeit noch eingehend geklärt.

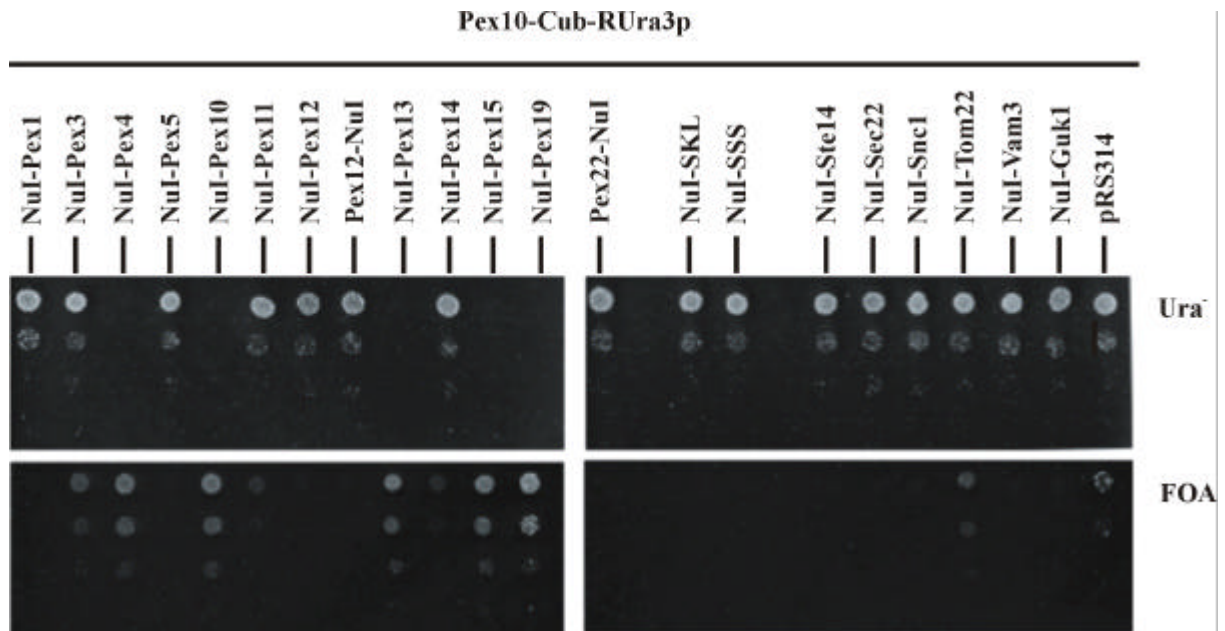


Abb. 3.12: Pex10-Cub-RUra3p interagiert mit den NuI-Fusionsproteinen von Pex4p, Pex10p, Pex13p, Pex15p und Pex19p.

Zellen des Wildtyps JD53, die Pex10-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (0 μM Met) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (0 μM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

3.3.2.2 Charakterisierung der Bindungsdomänen von Pex10p

Analog zur Unterteilung von Pex12p in Bindungsdomänen (3.3.1.2) wurde versucht, Pex10ΔRing-Cub-RUra3p sowie NuI-Pex10ΔRing in Wachstumstests zu analysieren. Auch bei stärkster Induktion des Methionin-Promotors (PMet) bei 0 μM war das Expressionsniveau von Pex10ΔRing-Cub-RUra3p jedoch so schwach, dass selbst die nur mit einem weiteren Leerplasmid transformierten Zellen auf Uracil-freien Medien nicht wachsen konnten (nicht gezeigt). Auch im FOA-Wachstumstest war das Hintergrundwachstum der Kontrollen bereits so hoch, dass keine eindeutigen Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Es ließ sich allerdings beobachten, dass die Interaktionssignale mit NuI-Pex15 und NuI-Pex19 noch deutlich hervortraten, während sich die Interaktionssignale mit NuI-Pex4 und NuI-Pex10 kaum noch über das Hintergrundniveau erhoben (nicht gezeigt). In der Folge wurde NuI-Pex10ΔRing gegen verschiedene Cub-RUra3p-Fusionsproteine getestet. In diesen Experimenten konnte jedoch keine Interaktion mit einem anderen Pex-Cub-RUra3p-Fusionsprotein festgestellt werden (nicht gezeigt). Die nach den Erfahrungen an Pex12p möglicherweise zu erwartende Interaktion zwischen dem Fragment von Pex10p und einer Fusion von Pex19p konnte nicht getestet werden, da nunmehr beide Proteine nur noch als NuI-Fusionsproteine vorlagen. Somit konnte keine Aussage über die Bindungseigenschaften der Ringdomäne von Pex10p getroffen werden.

3.3.2.3 Das Bindungsverhalten von Pex10-Cub-RUra3p in *pex*-Deletionsstämmen

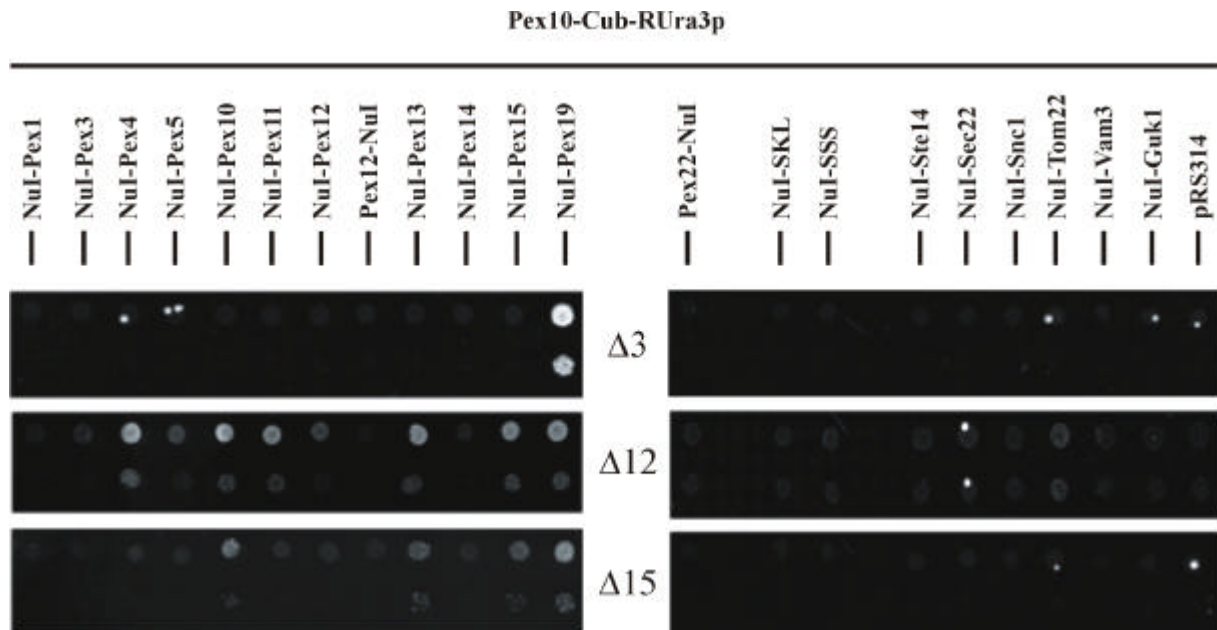


Abb. 3.13: Die Interaktionen von Pex10-Cub-RUra3p mit NuI-Pex10, -Pex13 und -Pex15 sind nicht von Pex12p oder Pex15p abhängig, erfordern aber die peroxisomale Membran. Die Interaktion von NuI-Pex4 mit Pex10-Cub-RUra3p scheint die Anwesenheit von Pex15p und der peroxisomalen Membran zu erfordern.

Zellen von JD53- Δ pex3 (Δ 3), JD53- Δ pex12 (Δ 12) oder JD53- Δ pex15 (Δ 15), die Pex10-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium 0 μ M Met und SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium 0 μ M Met (nicht gezeigt) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Fehlt durch Deletion von *PEX3* die peroxisomale Membran in der Zelle völlig, so kann im Wachstumstest nur noch die Interaktion von Pex10-Cub-RUra3p mit NuI-Pex19 nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Die übrigen Interaktionen, nämlich die mit NuI-Pex4, -Pex10, -Pex13 und -Pex15, können hier nicht mehr beobachtet werden. Sie alle sind in Zellen, denen Pex12p fehlt, jedoch nachweisbar. Allerdings scheint im Δ pex12-Deletionsstamm die Stabilität von Pex10-Cub-RUra3p herabgesetzt zu sein, da Interaktionen, die im Wildtypstamm nicht beobachtet werden, nun auftreten. Die Interpretation dieses Experiments ist daher nicht eindeutig. Dies trifft auf das Experiment im Δ pex15-Deletionsstamm nicht zu. Hier sind wiederum die Interaktionen von Pex10-Cub-RUra3p mit NuI-Pex10, -Pex13, -Pex15 und -Pex19 eindeutig messbar, die Interaktion zwischen Pex4p und Pex10p ist jedoch aufgehoben (Abb. 3.12).

Von hier konnten die Cub-RUra3p-Fusionsproteine von Pex13p und Pex4p zum Ausbau des Interaktionsnetzes verwendet werden. Pex13-Cub-RUra3p reagierte dabei stark mit NuI-Pex13, -Pex14, -Pex19 und -Tom22 (nicht gezeigt; vgl. Tab. 3.4 und Tab. 3.5).

Interessanterweise interagiert Pex13-Cub-RUra3 nicht mit NuI-Pex10. Da Pex13-Cub-RUra3p nicht funktionell ist, kann dies bedeuten, dass die mit dem funktionellen Pex10-Cub-RUra3p und NuI-Pex13 gemessene Interaktion durch die Modifikation des C-Terminus von Pex13p gestört ist. Dies würde darauf hinweisen, dass die Interaktion zwischen Pex10p und Pex13p für dessen Funktion wichtig ist. Da eine räumliche Nähe von Pex4p zu Pex10p noch nicht beschrieben worden ist, sollte als nächstes das lösliche Protein Pex4p als Cub-RUra3p-Fusionsprotein untersucht werden (Abb. 3.14).

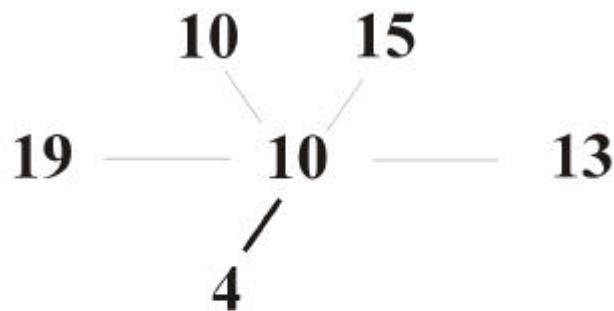


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der für Pex10-Cub-RUra3p beobachteten Interaktionen mit anderen Peroxinen. Von der hervorgehobenen Interaktion zwischen NuI-Pex4p und Pex10-Cub-RUra3p ausgehend wurde nun das Pex4-Cub-RUra3p-Fusionsprotein analysiert.

3.3.3 Pex4p

3.3.3.1 Pex4-Cub-RUra3p

Das lösliche Protein Pex4p liegt in der Hefezelle teilweise cytosolisch und teilweise peripher an die peroxisomale Membran gebunden vor (Abb. 3.17). Es besteht aus 183 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 21,1 kDa. Pex4p ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), das auch als Ubc10p bezeichnet wird. Wegen der beobachteten Interaktion zwischen NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p sollten die Interaktionen zwischen einem Pex4-Cub-RUra3p-Fusionsprotein mit den übrigen NuI-Peroxinen getestet werden. Pex4-Cub-RUra3p ist partiell funktionell. Auch bei stärkster Induktion des Methionin-Promotors (PMet) bei 0 μ M war das Expressionsniveau von Pex4-Cub-RUra3p jedoch nicht ausreichend, um den mit einem Leerplasmid transformierten Zellen volles Wachstum auf Uracil-freien Medien zu ermöglichen (nicht gezeigt). Die Menge an exprimiertem Fusionsprotein reichte jedoch für einen Interaktionstest auf FOA-haltigem Medium aus. Dieser FOA-Wachstumstest ist in Abb. 3.15 gezeigt. Der obere Wachstumstest (A) zeigt eine Platte nach 96-stündiger Inkubation bei 30°C, der untere (B) nach 48 Stunden unter diesen Bedingungen.

Die Signale der Zellen, die Pex4-Cub-RUra3p mit NuI-Pex4p koexprimieren, treten bereits nach 48 Stunden deutlich hervor. Ein weiteres Signal geringerer Intensität, das ebenfalls bereits nach 48 Stunden reproduzierbar detektiert werden kann, wird durch die Koexpression von NuI-Pex15 induziert. Dieses Signal sollte durch Verlängerung der Inkubationszeit deutlicher sichtbar gemacht werden (A). Dadurch entstanden jedoch bereits sehr starke Hintergrundsignale, so dass den nun zusätzlich sichtbar werdenden Interaktionen von Pex4-Cub-RUra3p mit NuI-Pex5, -Pex10, -Pex11, -Pex13, und -Pex19 keine Bedeutung beigemessen werden sollte, da auch NuI-Sec22 ein Signal ähnlicher Stärke zeigt.

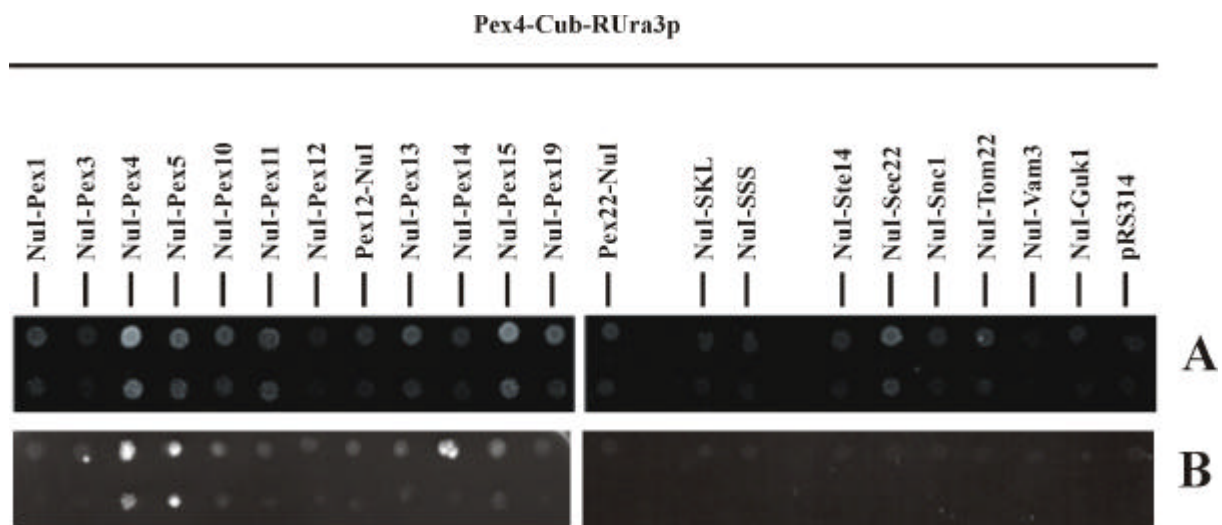


Abb. 3.15: Pex4-Cub-RUra3p interagiert mit NuI-Pex4p.

Zellen von JD53, die Pex4-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (0 µM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 µM CuSO₄ und wurden vier Tage (A) oder zwei Tage (B) bei 30°C inkubiert. Zwei unabhängige Experimente sind gezeigt. Der korrespondierende Wachstumstest auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (0 µM Met) brachte kein Ergebnis, weil die Menge an Pex4-Cub-RUra3p nicht ausreichte, den Zellen Wachstum auf diesem Medium zu ermöglichen. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt). Bei den in (B) unter den NuI-Pex5 und -Pex14 exprimierenden Zellen sichtbaren Kolonien handelt es sich um spontane Mutationen der Kotransformanten, nicht um Interaktionssignale.

Pex4p ist zu einem substantiellen Teil cytosolisch lokalisiert und liegt nur zum Teil an die peroxisomale Membran gebunden vor (Crane *et al.*, 1994; van der Klei *et al.*, 1998). Es ist wahrscheinlich, dass diese Lokalisation, bei der nur ein Teil des gesamten in der Zelle vorhandenen Pex4-Cub-RUra3p für die Interaktion mit peroxisomalen Membranproteinen zur Verfügung steht, eine Ursache für den fehlenden Nachweis der Interaktion zwischen Pex4-Cub-RUra3p und NuI-Pex10 ist.

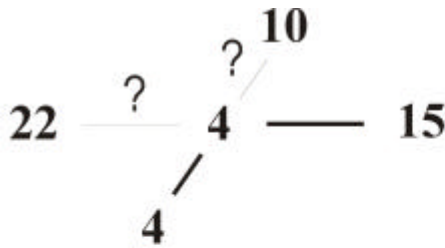


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der für Pex4-Cub-RUra3p beobachteten Interaktionen mit anderen Peroxinen. Mit NuI-Pex4 konnte im Split-Ub-System eine deutliche Interaktion gemessen werden, mit NuI-Pex15 eine schwache. Die zuvor mit NuI-Pex4 gemessene Nähe mit Pex10-Cub-RUra3p konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden, ebenso konnte die erwartete Interaktion von Pex4-Cub-RUra3p mit Pex22-NuI nicht beobachtet werden. Daher wurden nun die Interaktionen von Pex22-Cub-RUra3p mit den verschiedenen NuI-Test- und Kontrollproteinen analysiert.

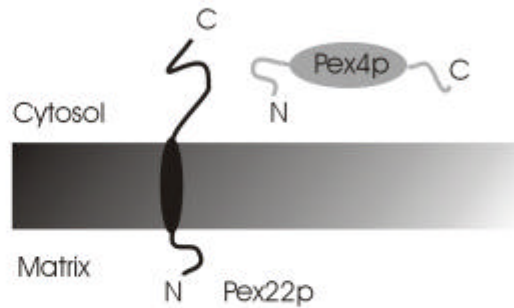


Abb. 3.17: Orientierung von Pex22p und Pex4p in bzw. an der peroxisomalen Membran. Pex22p ist ein integrales Membranprotein mit einer TMD, dessen C-Terminus ins Cytosol weist. Pex4p ist ein lösliches Protein mit überwiegend cytosolischer Lokalisation, das teilweise auch an die peroxisomale Membran gebunden vorliegt; vermutlich über Pex22p.

In jedem Falle überraschte das starke Signal mit Pex4 und auch eine Nähe von Pex4p zu Pex15p war bislang noch nicht beschrieben worden. Da sich die bereits in der Hefe *Pichia pastoris* beschriebene Interaktion zwischen Pex22p und Pex4p nicht in einem deutlichen Wachstum der Pex22-NuI und Pex4-Cub-RUra3p exprimierenden Kotransformante niederschlug, sollte versucht werden, die Interaktionen von Pex22-Cub-RUra3p zu messen (Abb. 3.16).

3.3.4 Pex22p

3.3.4.1 Pex22-Cub-RUra3p

Pex22p ist ein Protein aus 180 Aminosäuren (19,9 kDa), das die peroxisomale Membran einmal durchspannt und dessen C-Terminus cytosolisch ist (Abb. 3.17). Die Interaktion zwischen Pex22p und Pex4p wurde in *Pichia pastoris* beschrieben (Koller *et al.*, 1999), andere Bindungspartner waren bislang unbekannt.

Abb. 3.18 zeigt den FOA-Wachstumstest von JD53-Zellen, die Pex22-Cub-RUra3p mit den verschiedenen NuI-Fusionsproteinen oder einem Leervektor koexprimieren. Deutliche Interaktionen werden zwischen Pex22-Cub-RUra3p und NuI-Pex4 sowie NuI-Pex15 gemessen. Deutlich schwächere Signale sind mit NuI-Pex10 und NuI-Pex19 zu beobachten, und sehr schwache (nahe Hintergrund) für NuI-Pex13, Pex22-NuI und NuI-Tom22. Das relativ schwache Interaktionssignal zwischen Pex22-NuI und Pex22-Cub-RUra3p gewinnt an Bedeutung, wenn berücksichtigt wird, dass Pex22-NuI mit keinem der anderen Cub-RUra3p-Fusionsproteine ein Signal induzierte. Betrachtet man Pex12-NuI als das hier angemessene

Kontrollprotein, so spricht das Interaktionssignal von Pex22-NuI mit Pex22-Cub-RUra3p für eine Multimerisierung von Pex22p.

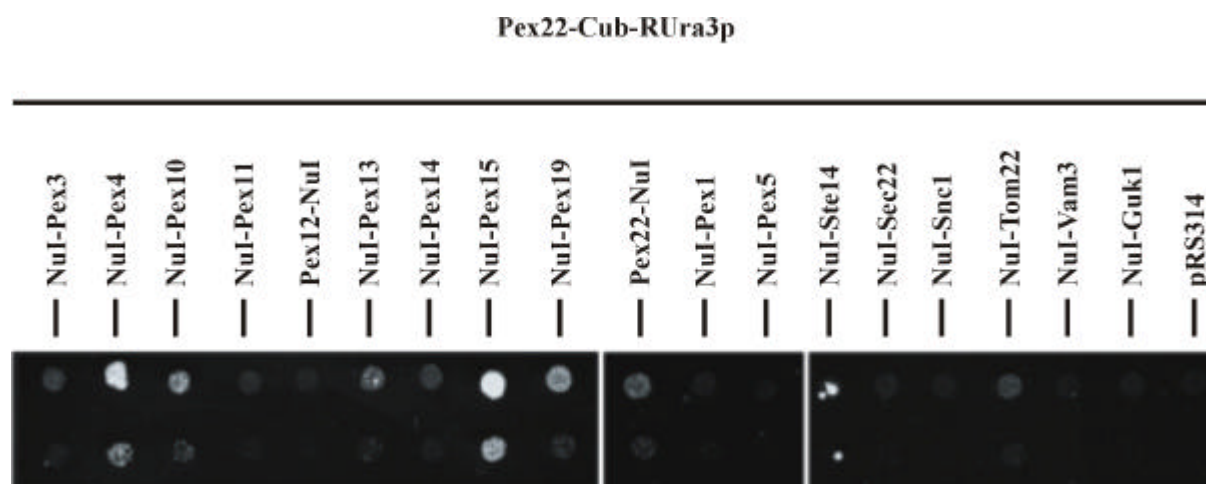


Abb. 3.18: Pex22-Cub-RUra3p interagiert mit den NuI-Fusionsproteinen von Pex4p, Pex10p, Pex15p und Pex19p.

Wildtyp-Zellen (JD53), die Pex22-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (100 µM Met) (nicht gezeigt) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (50 µM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 µM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Überraschend ist das deutliche Signal mit NuI-Pex15p, vor allem in Verbindung mit dem in Abschnitt 3.3.2.3 und Abb. 3.13 dargestellten Ergebnis einer stark inhibierten Interaktion zwischen Pex10-Cub-RUra3p und NuI-Pex4 in JD53-Δpex15. Pex15p scheint hier die Interaktion zwischen Pex10p und Pex4p zu vermitteln. Dabei interagiert es offenbar auch mit Pex22p, das Pex4p zur Membran rekrutiert. Denkbar wäre aber auch, dass die Stabilität einer Komponente durch das Fehlen des Pex15p beeinträchtigt wird.

3.3.5 Pex2p

Pex2p ist neben Pex10p und Pex12p das dritte Peroxin, das im C-terminalen Bereich einen Sequenzabschnitt aufweist, der Ähnlichkeit mit der Ring-Finger-Domäne besitzt. Wie für Pex10-Cub-RUra3p und Pex12-Cub-RUra3p beschrieben wurde auch ein Pex2-Cub-RUra3p-Fusionsprotein erstellt und mit Hilfe der NuI-Fusionsproteine die Interaktionen zwischen Pex2p und den übrigen Peroxinen vermessen. Im Gegensatz zu Pex10p und Pex12p interagiert das Fusionsprotein von Pex2p jedoch nur mit NuI-Pex19 (vgl. Abb. 3.27 und 3.5.1).

3.3.6 Pex11p

Pex11p ist ein integrales peroxisomales Membranprotein mit zwei TMD, dessen Termini beide ins Cytosol weisen. Da Pex11p spezifisch an der Proliferation der Peroxisomen und am Transport mittellanger Fettsäuren beteiligt ist und nicht wie die vielen anderen Peroxine am Import peroxisomaler Proteine (van Roermund *et al.*, 1998), war interessant zu sehen, ob sich diese Rolle im Interaktionsmuster von Pex11-Cub-RUra3p niederschlagen würde. Bisher zeigte NuI-Pex11 mit keinem der getesteten Cub-RUra3p-Proteine ein deutliches Signal (vgl. 3.3.7).

3.3.6.1 Pex11-Cub-RUra3p

Da Pex11-Cub-RUra3p sehr stark exprimiert wird, wurde die Expression des Fusionsproteins mit 200 μM (Ura⁻-Test) bzw. 500 μM (FOA-Test) Methionin im Medium während der Interaktionstests reduziert. In beiden Tests zeigt Pex11-Cub-RUra3p eine deutliche Interaktion mit NuI-Pex11 und NuI-Pex19. Alle anderen NuI-Fusionsproteine induzieren kein Signal im Interaktionstest. Somit scheint Pex11p in *Saccharomyces cerevisiae* Homodimere zu bilden. Eine solche Homodimerisierung ist für das Pex11p-Homolog aus *Trypanosoma brucei* bereits beschrieben worden (Marshall *et al.*, 1996).

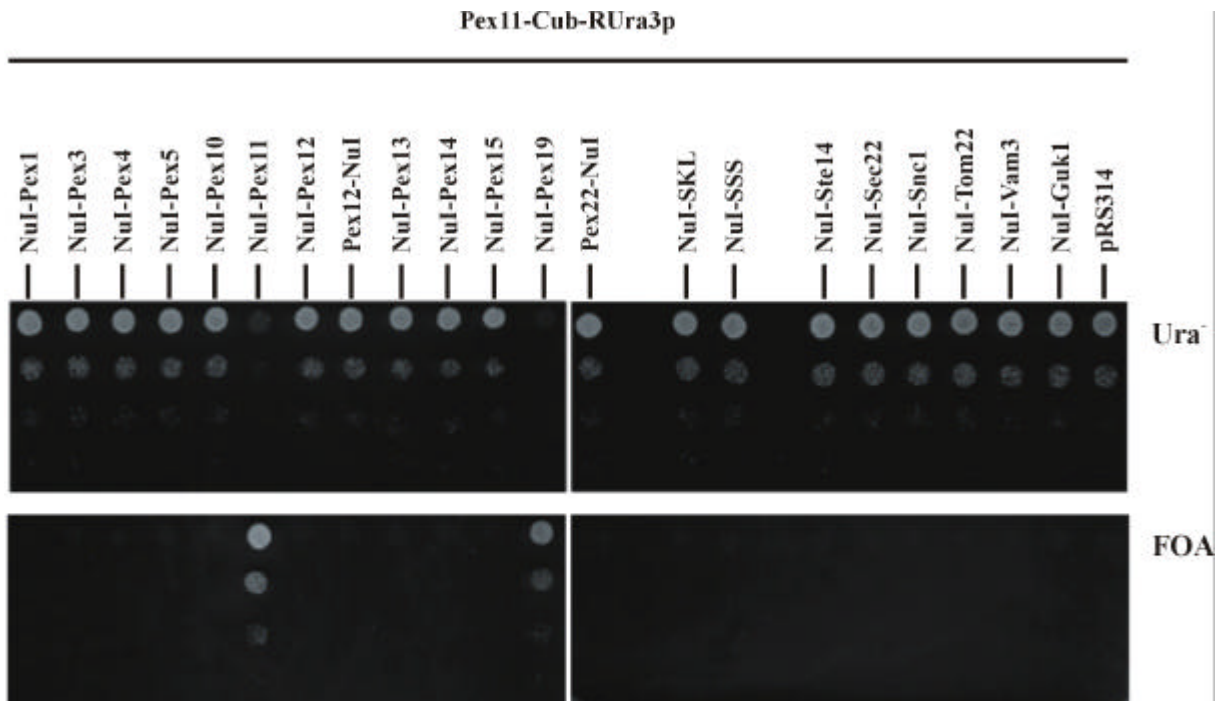


Abb. 3.19: Pex11-Cub-RUra3p interagiert mit den NuI-Fusionsproteinen von Pex11p und Pex19p. Zellen von JD53, die Pex11-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (200 μM Met) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (500 μM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

3.3.7 Die mittels des Split-Ubiquitin-Systems erstellte Interaktionskarte der Peroxine

Im weiteren Verlauf wurden auch die übrigen Komponenten der peroxisomalen Importkaskade Pex5p, Pex13p, Pex14p und Pex17p sowie das an der frühen Biogenese der Membran beteiligte Pex3p als Cub-RUra3p-Fusionen gegen die NuI-Fusionsproteine der Interaktionsmatrix getestet. Da diese Experimente vorwiegend keine neuen zu den bereits in der Literatur bekannten Interaktionen beisteuern konnte, sind die Ergebnisse der Experimente nur tabellarisch dargestellt. Neu sind jedoch die zahlreichen Interaktionen von NuI-Pex15, das mit Pex3-, Pex4-, Pex10-, Pex12-, Pex13-, Pex14-, Pex17- und Pex22-Cub-RUra3p interagiert. Auffallend ist zudem, dass viele der für Pex5p und Pex14p beschriebene Interaktionen mit dem Split-Ub-Verfahren nicht nachgewiesen werden konnten (vgl. auch Diskussion). Die Ergebnisse der Interaktionstests von Pex3-Cub-RUra3p sind im Abschnitt 3.6.3.2 dargestellt. Als weiteres Kontrollprotein wurde das von N. Lewke (2000) eingehend untersuchte Ste14-Cub-RUra3p verwendet. Ste14p ist ein Protein, das an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und somit nicht nur als Negativkontrolle dient, sondern darüber hinaus einzelne Peroxine in diesem Kompartiment spezifisch nachweisen kann (mehrere Peroxine waren zu Teilen in der ER-Membran nachgewiesen worden; vgl. Diskussion). Eine Übersicht über die Resultate aller zur Erstellung der Interaktionskarte der peroxisomalen Membranproteine getesteten Proteinpaaire geben die Tabellen 3.4 (Ura⁻) und 3.5 (FOA). Wie bereits beschrieben sind die Ergebnisse zwischen beiden Testverfahren nicht in allen Fällen identisch; einige Interaktionen konnten nur in einem der beiden Tests beobachtet werden. Es entsteht der Eindruck, dass die Abgrenzung zwischen Interaktion und Nicht-Interaktion im FOA-Test schärfer erfolgt und die Signale hier klarer sind. Für die graphische Darstellung des Netzwerks wurden daher die Ergebnisse aus den FOA-Interaktionstests herangezogen.

Wachstumstest auf SD Ura

NuI-	Pex 1	Pex 3	Pex 4	Pex 5	Pex 10	Pex 11	Pex 12	12- NuI	Pex 13	Pex 14	Pex 15	Pex 19	22- NuI	SKL	SSS	Ste	Sec	Snc	Tom	Vam	Guk	pRS	
Pex2-CRU	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	1	22	3	1	314	
Pex2AN-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	
Pex3-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	+(+)	-	-	+++	-	-	-	-	+	-	(+)	-	-	-	
Pex4-CRU*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Pex5-CRU	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pex10-CRU	-	+	+++	-	+(+)	+(+)	-	-	++	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
in Apex3**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	
in Apex12**	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(+)	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
in Apex15**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	(+)	-	++	-	-	-	
Pex10AR-CRU*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Pex11-CRU	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pex12-CRU	-	-	(+)	(+)	+++	+(+)	-	-	+++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
in Apex3**	-	-	(+)	-	+	+	-	-	+	-	+	+++	-	-	-	-	(+)	-	+++	-	-	-	
in Apex10**	-	-	+(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
in Apex15**	-	-	++	-	+++	(+)	-	-	+++	(+)	+++	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
Pex12Ring-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	(+)	-	
Pex12AR-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(+)	-	
Pex13-CRU	-	-	(+)	+	(+)	(+)	(+)	-	++	++	++	+++	-	-	-	(+)	(+)	-	+	-	-	-	
Pex14-CRU	-	(+)	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	
Pex17-CRU	-	+	-	+	-	-	-	-	++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pex22-CRU	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	++(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ste14-CRU	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	++	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-	

Tab. 3.4: Interaktionen der Test- und Kontrollproteine. Ergebnisse der Wachstumstests auf Medien ohne Uracil.

Starke Interaktionen sind mit +++ gekennzeichnet, mittelstarke mit ++, schwache mit +, solche, die auch im Bereich erhöhter Hintergrundreaktion liegen könnten, mit (+). Liegt eine Zuordnung zwischen diesen Stufen, so wird die höhere zusätzlich angegeben und eingeklammert; +(+) etwa indiziert eine schwache bis mittlere Stärke. - bezeichnet eine Proteinpaarung, die nicht zu einem Wachstumssignal führte.

Es bedeuten: CRU = Cub-RUra3p, Apex3/10/12/15 = JD53-Apex3/10/12/15-Zellen, 12-NuI und 22-NuI = Pex12-NuI und Pex22-NuI, Pex10/12AR = Pex10/12ARing.

* = keine Daten messbar, weil Expression zu schwach ** = Daten sehr schwach da hohe Hintergrundsignale / geringe Expression

Wachstumstest auf 5'-FOA

NuL	Pex 1	Pex 3	Pex 4	Pex 5	Pex 10	Pex 11	Pex 12	12-NuL	Pex 13	Pex 14	Pex 15	Pex 19	22-NuL	SKL	SSS	Ste 14	Sec 22	SnC 1	Tom 22	Vam 3	Guk 1	pRS 314
Pex2-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pex2ΔN-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
Pex3-CRU	-	+(+)	-	-	+	+	+	-	++	-	+++	+	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
Pex4-CRU	(+)	-	+++	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-
Pex5-CRU	+	-	-	+++	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pex10-CRU	- (+)	(+)	+++	(+)	+++	-	-	-	+(+)	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
in Δpex3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
in Δpex12	-	-	+++	-	++	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
in Δpex15	-	-	(+)	-	++	(+)	-	-	+	-	+	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Pex10ΔR-CRU*	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	(+)	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pex11-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pex12-CRU	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+++	+	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
in Δpex3	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
in Δpex10	-	-	(+)	-	+++	-	-	-	+++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
in Δpex15	-	-	+	-	+++	-	-	-	+++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
Pex12Ring-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(+)	-
Pex12ΔR-CRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
Pex13-CRU	-	-	(+)	+	(+)	-	-	-	++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
Pex14-CRU	(+)	-	(+)	+++	-	-	-	-	++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pex17-CRU	(+)	-	-	++	-	-	-	-	++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pex22-CRU	-	-	+++	-	++	-	-	-	(+)	-	+++	++	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ste14-CRU	(+)	++	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	++	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-

Tab. 3.5: Interaktionen der Test- und Kontrollproteine. Ergebnisse der Wachstumstests auf Medien, die 5'-FOA enthalten.

Starke Interaktionen sind mit +++ gekennzeichnet, mittelstarke mit ++, schwache mit +, solche, die auch im Bereich erhöhter Hintergrundreaktion liegen könnten, mit (+). Liegt eine Zuordnung zwischen diesen Stufen, so wird die höhere zusätzlich angegeben und eingeklammert; +(+) etwa indiziert eine schwache bis mittlere Stärke. – bezeichnet eine Proteinpaaung, die nicht zu einem Wachstumssignal führte.

Es bedeuten: CRU = Cub-RUra3p, Δpex3/10/12/15 = JD53-Δpex3/10/12/15-Zellen, 12-NuL und 22-NuL = Pex12-NuL und Pex22-NuL, Pex10/12ΔR = Pex10/12ΔRing.

* = Daten sind sehr schwach, da hoher Hintergrund. ** = nur aus FOA-Wachstumstests mit langer Inkubationsdauer

3.4 Bestätigung neuer Interaktionen durch alternative Techniken

3.4.1 Die Interaktionen von Pex10p

3.4.1.1 Koimmunopräzipitationen belegen Interaktionen von Pex10p mit Pex10p und Pex12p

Der Split-Ub-Test zeigte, dass Pex10p möglicherweise multimerisiert und zu den Peroxinen Pex4p, Pex10p, Pex12p, Pex13p, Pex15p, Pex19p und Pex22p eine enge Nachbarschaft aufweist. Diese multiplen Interaktionen weisen Pex10p als eine zentrale Schaltstelle im peroxisomalen Importapparat aus. Allerdings misst das Split-Ub-Verfahren nicht unbedingt direkte Proteininteraktionen. Einige der gemessenen Interaktionen der Fusionsproteine könnten daher auch aus der gemeinsamen Bindung an einen dritten Partner entstehen. Einige der gemessenen Interaktionen (Pex10p-Pex12p, Pex13p-Pex14p, Pex4p-Pex22p) wurden während dieser Arbeit von anderen Arbeitsgruppen mit anderen Methoden bestätigt. Da das Split-Ub-Verfahren eine neue Methode zur Darstellung peroxisomaler Membranproteine und ihrer Interaktionen ist, wurde versucht, einige der neu gefundenen Interaktionspartner von Pex10p durch Koimmunopräzipitationsexperimente zu bestätigen. Dazu wurden die genomischen Kopien von *PEX4*, *PEX10*, *PEX11*, *PEX12* und *PEX22* mit einer neunfach repetierten *c-MYC*-Sequenz verlängert und in JD53-Zellen zusammen mit Pex10-6ha koexprimiert..

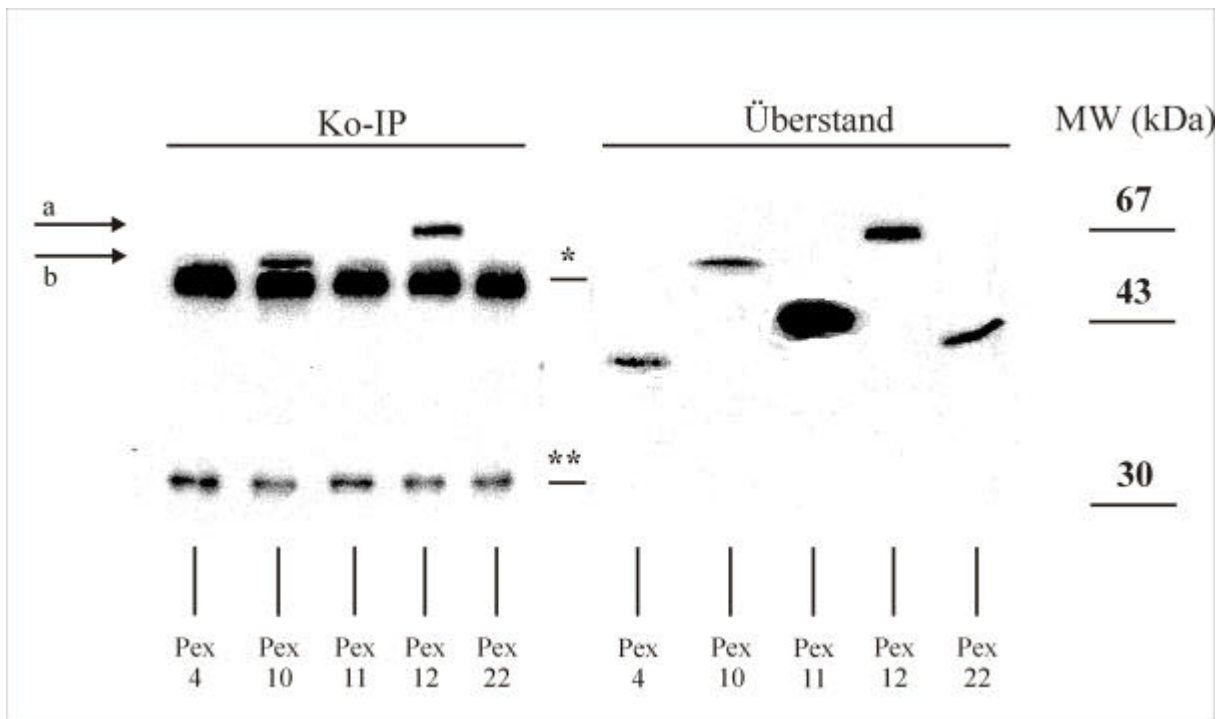


Abb. 3.20: Pex10-9Myc und Pex12-9Myc, nicht aber Pex4-9Myc und Pex22-9Myc, können mit Pex10-6ha koimmunopräzipitiert werden. JD53-Zellen, die Pex10-6ha unter Kontrolle des Methionin-Promotors mit dem jeweiligen 9Myc-Fusionsprotein des angegebenen Peroxins koexprimierten, wurden wie unter 2.2.2.5 beschrieben aufgeschlossen. Die erhaltenen Gesamtproteinextrakte wurden für 60 min unter langsamer Inversion bei 4°C mit anti-ha-Antikörper, anschließend ün unter gleichen Bedingungen mit Protein A-Sepharose inkubiert.

Nach dreifachem Waschen wurden die präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE (10,0 %) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-myc-Antikörpern behandelt, um die kopräzipitierten Pex-9Myc-Fusionsproteine nachzuweisen (links). Zum Nachweis der Expression aller zu testenden Proteine wurden Proben der Überstände der Gesamtproteinextraktionen in der gleichen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-myc-Antikörpern detektiert (rechts; Intensität gegenüber linker Bildhälfte zehnfach erhöht). Der ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennte Molekulargewichtsstandard ist ganz rechts abgebildet (Angaben in kDa). a verweist auf die Laufhöhe des koimmunopräzipitierten Pex12-9Myc, b auf Pex10-9Myc. * bezeichnet die Laufhöhe der schweren, ** die der leichten Kette der Antikörper.

Die Interaktion zwischen Pex10-6ha und Pex12-9Myc diente hierbei als Positivkontrolle. Pex11-9Myc diente als Negativkontrolle (vgl. 3.3.5). Pex11-9Myc wurde nicht durch Pex10-6ha präzipitiert, während Pex12-9Myc eindeutig mit Pex10-6ha zusammen präzipitiert werden konnte (Abb. 3.20). Ähnlich eindeutig war die Präzipitation von Pex10-9Myc durch Pex10-6ha. Dieses Resultat bestätigt den Split-Ub-Test und lässt auf eine Di- oder Multimerisierung von Pex10p schließen. Im Unterschied zu Pex10-9Myc und Pex12-9Myc konnten die Fusionsproteine von Pex4p und Pex22p nicht mit Pex10-6ha zusammen präzipitiert werden.

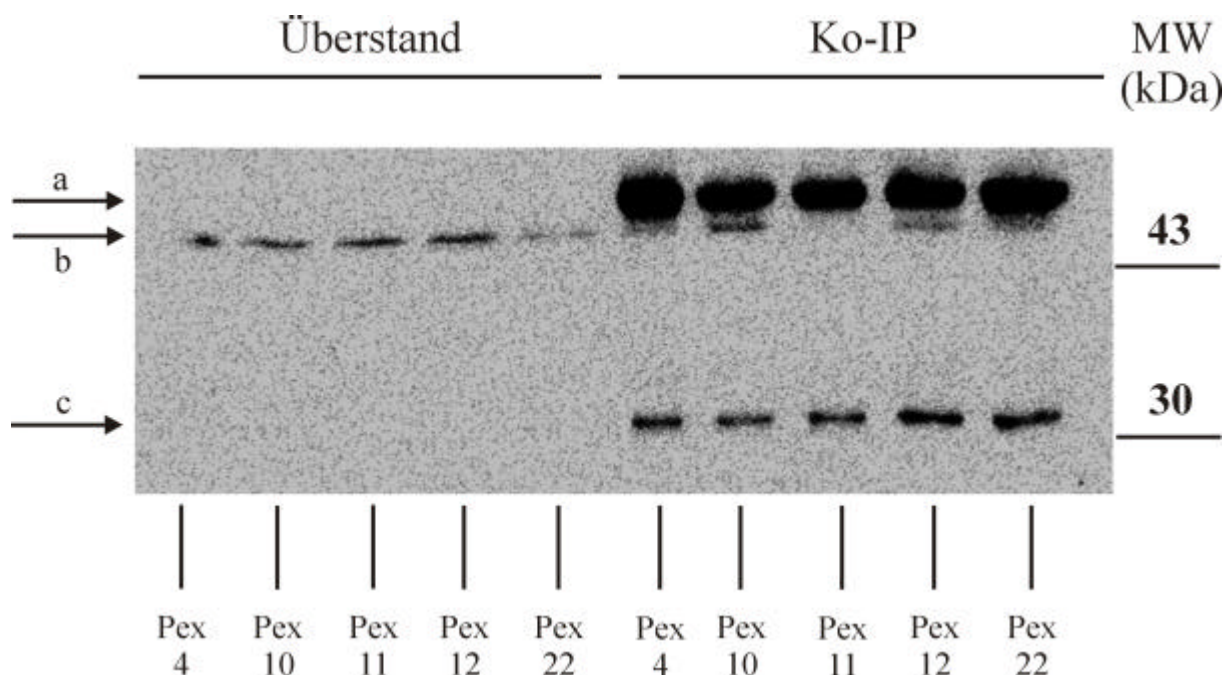


Abb. 3.21: Pex10-6ha kann durch Pex10-9Myc, Pex12-9Myc und möglicherweise auch durch Pex4-9Myc und Pex22-9Myc, nicht aber durch Pex11-9Myc koimmunopräzipitiert werden. JD53-Zellen, die Pex10-6ha unter Kontrolle des Methionin-Promotors mit dem jeweiligen 9-Myc-Fusionsprotein des angegebenen Peroxins koexprimierten, wurden wie unter 2.2.2.5 beschrieben aufgeschlossen. Die erhaltenen Gesamtproteinextrakte wurden für 60 min unter langsamer Inversion bei 4°C mit anti-myc-Antikörper, anschließend ün unter gleichen Bedingungen mit Protein A-Sepharose inkubiert. Nach dreifachem Waschen wurden die präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE (10,0 %) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit anti-ha-Antikörpern behandelt, um die Pex10-6ha-Fusionsproteine nachzuweisen (links). Der ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennte Molekulargewichtsstandard ist ganz rechts abgebildet (Angaben in kDa). a verweist auf die Laufhöhe der schweren, c auf die der leichten Kette der Antikörper, b bezeichnet die Laufhöhe von Pex10-6ha.

Proteinextrakte der gleichen Transformanten wurden auch mit anti-myc-Antikörper behandelt, um anschließend Pex10-6ha im Western Blot nachzuweisen. Die Interaktionen von Pex10-6ha mit Pex10p- und Pex12p-Myc-Fusionsproteinen konnten hier ebenfalls beobachtet werden. Darüber hinaus kann Pex10-6ha mit Pex4-9Myc und Pex22-9Myc, nicht jedoch mit Pex11-9Myc, kopräzipitiert werden. Die Menge an kopräzipitiertem Pex10-6ha war allerdings sehr gering (Abb. 3.21) und die Ergebnisse konnten im umgekehrten Verfahren (Abb. 3.20) nicht bestätigt werden. Dennoch ist die Beobachtung ein zusätzlicher Hinweis auf eine direkte Interaktionen von Pex22p und Pex4p mit Pex10p.

3.4.1.2 Koimmunopräzipitationen von Pex10p mit Pex10p in *pex*-Deletionsstämmen

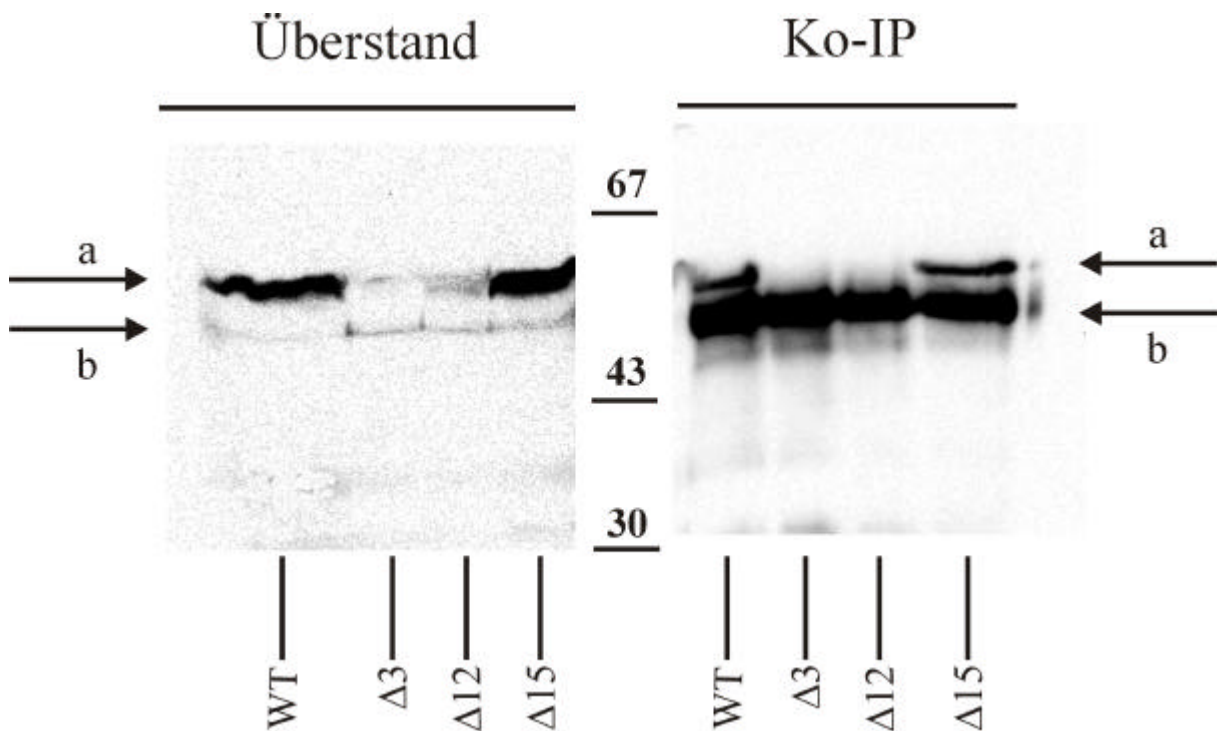


Abb. 3.22: Pex10-9Myc kann in JD53-(WT)-Zellen und in JD53-Dpex15-Zellen mit Pex10-6ha koimmunopräzipitiert werden, ist aber in JD53-Dpex3- und JD53-Dpex12-Zellen instabil. JD53-Zellen (WT) oder Zellen der angegebenen Deletionsstämme JD53- Δ pex3 (Δ 3), JD53- Δ pex12 (Δ 12) oder JD53- Δ pex15 (Δ 15), die Pex10-6ha und Pex10-9Myc koexprimierten, wurden wie zuvor beschrieben behandelt und die Proteinextrakte mit anti-ha-Antikörper immunopräzipitiert (Abb. 3.20). Die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte (links) bzw. der gewaschenen Präzipitate (rechts) erfolgte durch 10,0%-SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und anschließenden Nachweis der Proteine durch anti-myc-Antikörper. Der ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennte Molekulargewichtsstandard ist mittig abgebildet (Angaben in kDa). a verweist auf die Laufhöhe von Pex10-9Myc, b auf die der schweren Kette des Antikörpers.

Die Ergebnisse der Interaktionstests von Pex10-Cub-RUra3p in den verschiedenen *pex*-Deletionsstämmen (3.3.2.3) sollten ebenfalls durch Koimmunopräzipitation überprüft werden. Abb. 3.22 zeigt deutlich, dass nur in Zellen des Stammes JD53- Δ pex15 ähnliche Mengen von

Pex10-9Myc vorliegen wie im WT. Wie im Split-Ub-Test kann die „Dimerisierung“ von Pex10p unverändert gut gemessen werden. In Zellen der Stämme JD53- Δ pex3 und JD53- Δ pex12 hingegen fällt die Menge von Pex10-9Myc im Gesamtproteineextrakt fast unter die Nachweisgrenze der Immunodetektion ab. Offensichtlich wird der zelluläre Abbau von Pex10p in Abwesenheit von Pex12p sehr beschleunigt. Zu dem selben Schluss gelangt man durch die Beobachtungen des hohen Hintergrundsignals der Interaktionen von Pex10-Cub-RUra3p in JD53- Δ pex12 im Wachstumstest (Abb. 3.13). Ob die gleiche Interpretation auch für JD53- Δ pex3 gilt, kann hingegen nicht mit Sicherheit behauptet werden. Hier war der Hintergrund im Split-Ub-Interaktionstest geringer, und die gezeigte Misslokalisierung peroxisomaler Membranproteine in Abwesenheit peroxisomaler Membranen (wie in JD53- Δ pex3 der Fall) ins Mitochondrium macht fraglich, ob das verwendete Protokoll für die Koimmunopräzipitation auch die in der mitochondrialen Membran integrierten Membranproteine solubilisieren kann.

3.4.2 Die Nähe von Pex4p zu Pex4p

3.4.2.1 Die Nähe von Pex4-Cub-RUra3p zu NuI-Pex4 ist spezifisch

Die im Split-Ubiquitin-Test gemessene Interaktion zwischen Pex4-Cub-RUra3p und NuI-Pex4 gemessene Interaktion sollte eingehender untersucht werden. Zunächst stellte sich jedoch die Frage, ob diese Interaktion tatsächlich eine spezifische Affinität zwischen den beiden Pex4p-Fusionen darstellt. Möglich wäre, dass NuI-Pex4 und Pex4-Cub-RUra3p nur deswegen miteinander interagieren, weil das Ub-konjugierende Enzym Pex4p noch eine Restaffinität für das angekoppelte Nub oder Cub besitzt. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde Pex4-Cub-RUra3p zusammen mit NuI-Pex4, NuI-Ubc6, NuI-Guk1 oder einem Leerplasmid (pRS314) koexprimiert. Ubc6p ist wie Pex4p ein Ub-konjugierendes Enzym. Träfe meine Befürchtung zu, so sollte auch NuI-Ubc6 mit Pex4-Cub-RUra3p interagieren. Dies trifft nicht zu. Abb. 3.23 zeigt deutlich, dass nur NuI-

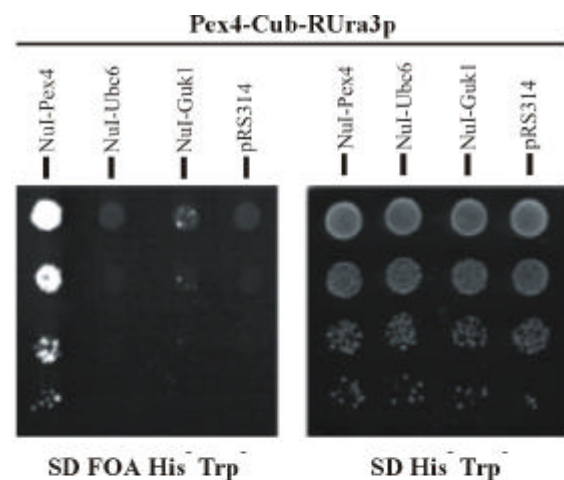


Abb. 3.23: Die Interaktion von NuI-Pex4 und Pex4-Cub-RUra3p ist spezifisch für Pex4 und nicht für Ubc-Proteine.

JD53-Zellen, die Pex4-Cub-RUra3p mit NuI-Pex4, NuI-Ubc6, NuI-Guk1 oder einem Leerplasmid koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻ Medium 0 μ M Met mit 100 μ M CuSO₄ aufgetropft. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. Zur Überprüfung der Verdünnung und Auftragung gleicher Zellzahlen wurde die Verdünnungsreihe auch auf SD His⁻ Trp⁻ aufgetragen.

Pex4 (NuI-Ubc10), nicht aber NuI-Ubc6 mit Pex4-Cub-RUra3p in Zellen koexprimiert im FOA-Wachstumstest Interaktion anzeigt. Damit ist die gemessene Nähe der beiden Pex4-Fusionsproteine spezifisch.

3.4.2.2 Pex4p kann nicht mit Pex4p koimmunopräzipitiert werden

Nachdem die Spezifität der im Split-Ubiquitin-Verfahren gemessenen Nähe zwischen Pex4p und Pex4p belegt war, sollte die Interaktion durch eine alternative Methode bestätigt werden. Hierzu wurden Pex4-6ha und Pex4-9Myc in JD53-Zellen koexprimiert, die Zellen wie beschrieben aufgeschlossen (2.2.2.5), und eine Koimmunopräzipitation mit anti-ha-Antikörper durchgeführt. Wie Abb. 3.24 verdeutlicht, werden weder Pex4-9Myc noch die Negativkontrolle Pex11-9Myc mit Pex4-6ha kopräzipitiert.

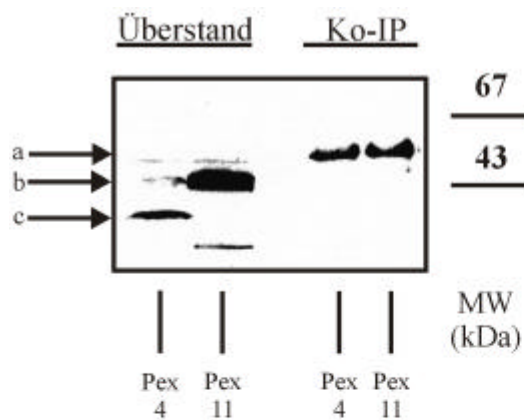


Abb. 3.24: Pex4-9Myc kann nicht mit Pex4-6ha koimmunopräzipitiert werden.

JD53-Zellen, die Pex4-6ha und Pex4-9Myc koexprimierten, wurden wie zuvor beschrieben behandelt und die Proteinextrakte mit anti-ha-Antikörper immunopräzipitiert (Abb. 3.20). Die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte (links) bzw. der gewaschenen Präzipitate (rechts) erfolgte durch 12,5%-SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und anschließenden Nachweis der Proteine durch anti-myc-Antikörper. Der ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennte Molekulargewichtsstandard ist rechts abgebildet (Angaben in kDa). a verweist auf die Laufhöhe der schweren Kette des Antikörpers, b auf die von Pex11-9Myc und c auf die von Pex4-9Myc.

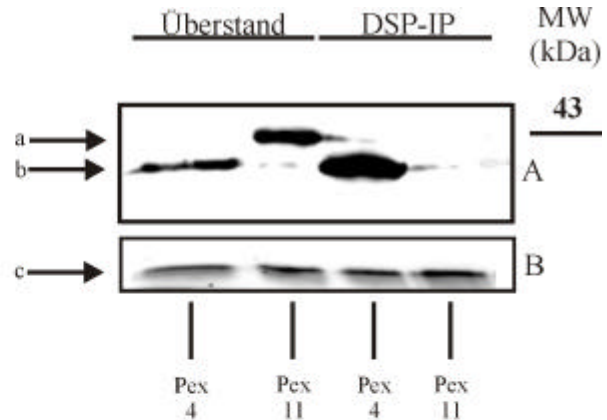


Abb. 3.25: Pex4-9Myc kann nach chemischer Kreuzvernetzung mit Pex4-6ha koimmunopräzipitiert werden.

A: JD53-Zellen, die Pex4-6ha und Pex4-9Myc koexprimierten, wurden spheroblastiert, aufgeschlossen und die Extrakte mit DSP kreuzvernetzt. Nach dem Stopp der Reaktion wurden die Proteinextrakte wie zuvor beschrieben mit anti-ha-Antikörper immunopräzipitiert (Abb. 3.20). Die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte (links) bzw. der gewaschenen Präzipitate (rechts) erfolgte durch 12,5%-SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und anschließenden Nachweis der Proteine durch anti-myc-Antikörper. Der ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennte Molekulargewichtsstandard ist rechts abgebildet (Angabe in kDa). a verweist auf die Laufhöhe von Pex11-9Myc, b auf die von Pex4-9Myc. Die Bande der schweren Kette des Antikörpers war bei dieser Kontrastierung nicht erkennbar (jedoch bei höherer). B: Um die gleichmäßige Expression und Auftragung von Pex4-6ha zu überprüfen, wurde die selbe Membran von den anti-myc-Antikörpern befreit und der Nachweis der Proteine mit anti-ha-Antikörpern wiederholt (c).

3.4.2.3 Pex4p kann durch chemische Kreuzvernetzung mit Pex4p präzipitiert werden

Um eine eventuell schwächere oder auch nur temporäre Bindung zwischen den verschiedenen Pex4-Fusionsproteinen zu detektieren, wurden Pex4-6ha und Pex4-9Myc in JD53-Zellen

koexprimiert, die Zellen spheroblastiert und wie unter 2.2.2.6 beschrieben der Gesamtproteinextrakt mit DSP chemisch kreuzvernetzt. Pex4-6ha wurde anschließend immunopräzipitiert, das DSP mit β -Mercaptoethanol gespalten und die Proben in der denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. In der Western Blot Analyse mit anti-myc-Antikörpern in Abb. 3.25 wird deutlich, dass Pex4-9Myc durch DSP mit Pex4-6ha kreuzvernetzt und koimmunopräzipitiert werden konnte, während die Negativkontrolle Pex11-9Myc selbst nach Kreuzvernetzung nicht mit Pex4-6ha zusammen präzipitiert wurde. Die Behandlung der gleichen Proben mit anti-ha-Antikörper zeigt eine ungefähr gleichmäßige Expression von Pex4-6ha in allen Proben (Abb. 3.25B). Dieses Ergebnis bestätigt die räumliche Nähe, die mittels des Split-Ub gemessen wurde. Es bleibt zunächst offen, ob die relativ harschen Bedingungen der Koimmunopräzipitation nicht erlaubten, eine Pex4p-Pex4p-Interaktion zu erfassen, oder ob es sich tatsächlich um eine kinetisch sehr labile Interaktion handelt.

3.4.2.4 Pex4p und Pex4p interagieren im Two-Hybrid-Test nicht miteinander

Die Frage, ob Pex4p direkt an Pex4p bindet oder ob die mittels der Split-Ub-Methode und durch die chemische Kreuzvernetzung gemessene räumliche Nähe von Pex4-Cub-RUra3p und NuI-Pex4p, bzw. Pex4-6ha und Pex4-9Myc die Anwesenheit weiterer am Peroxisom lokalisierter Faktoren voraussetzt, ließ sich durch einen Two-Hybrid-Test weiter eingrenzen. Dazu wurde das Leseraster von *PEX4* hinter die Sequenz der DNS-Bindedomäne bzw. der Aktivierungsdomäne von *GAL4* kloniert. Beide Fusionsproteine müssen in den Zellkern importiert werden und dort - im Falle ihrer Interaktion - die Transkription des *HIS3*-Gens induzieren. Die Zugabe des Histidin-Antimetaboliten 3-AT sollte die Schwelle für ein positives Wachstumssignal erhöhen. Abb. 3.26 macht deutlich, dass nur die die Positivkontrolle (das Vektorpaar pAD-GAL4 JuBel 2.III.1 und pBD-GAL4 cam Bkn 3 Δ 2, Judith Müller) exprimierenden Y190-Zellen auf dem Histidin-freien und mit 3-AT versetzten Medium wachsen konnten. Die Koexpression von pAD-Pex4 und pBD-Pex4 führte zu keinem Wachstum der Zellen. Offensichtlich kann die Pex4p-Pex4p-Interaktion nicht im Zellkern rekonstituiert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im Split-Ub-Test gemessene Nähe zwischen Pex4p und Pex4p spezifisch ist und auch durch eine weitere Methode verifiziert werden kann. Bei dieser Nähe handelt es sich vermutlich um eine temporäre oder kinetisch sehr labile

Interaktion, für deren Zustandekommen wahrscheinlich weitere am Peroxisom lokalisierte Faktoren erforderlich sind.

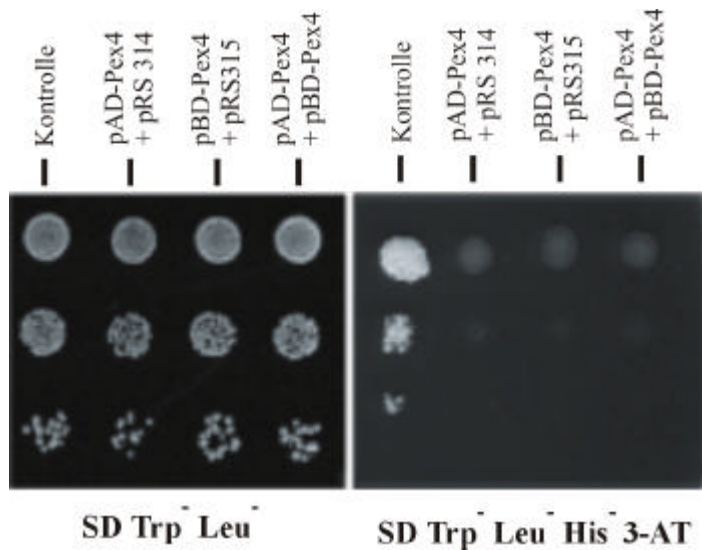


Abb. 3.26: pAD-Pex4 und pBD-Pex4 reagieren im Two-Hybrid-Test nicht miteinander.

Y190-Zellen, die pAD-Pex4 gemeinsam mit pBD-Pex4, jeweils eines dieser Plasmide zusammen mit einem Leerplasmid oder aber pAD-GAL4 JuBel 2.III.1 und pBD-GAL4 cam Bkn 3Δ2 („Kontrolle“) als Positivkontrolle exprimierten, wurden auf SD Trp⁻ Leu⁻ His⁻ 3-AT-Medium (mit 10 μM 3-AT) aufgetropft. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. Zur Überprüfung der Verdünnung und Auftragung gleicher Zellzahlen wurde die Verdünnungsreihe auch auf SD Trp⁻ Leu⁻ aufgetragen.

3.5 Untersuchung spezifischer Fragestellungen mit Hilfe des Split-Ub in *pex*-Deletionsmutanten

Um spezifische Fragestellungen, die sich aus der Interaktionskarte der peroxisomalen Membranproteine, aber auch aus der aktuellen Literatur zu diesen Proteinen ergaben, beantworten zu können, sollte das Split-Ubiquitin-System, ähnlich wie bereits für Pex10-Cub-RUra3p und Pex12-Cub-RUra3p beschrieben (3.3.1.3 bzw. 3.3.2.3), in eigens konstruierten *pex*-Deletionsmutanten von JD53 eingesetzt werden.

3.5.1 Gibt es zwei Transkripte von PEX2, die unterschiedlich lokalisiert werden?

Liu *et al.* (1996) hatten festgestellt, dass vom Gen *PEX2* in *Saccharomyces cerevisiae* zwei unterschiedlich lange mRNS-Moleküle transkribiert werden. Die längere mRNS entspricht dabei dem vollständigen Leseraster des Gens, während die kürzere mRNS am ersten nachfolgenden ATG im gleichen Leseraster initiiert. Die korrespondierenden Proteine sind 30,7 kDa bzw. 25 kDa groß. Die Gruppe beobachtete, dass das längere Transkript auf Ölsäure-haltigen Medien vierfach höher induziert wird als auf Glukose-haltigen Medien, während die kürzere mRNS bei der Gabe von Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle zehnfach höher transkribiert wird. Da in *S. cerevisiae* Glycerol eine erhöhte Aktivität der Mitochondrien induziert und Ölsäure zur Proliferation der Peroxisomen führt, vermuteten die Autoren, dass sich in der auffällig sauren N-terminalen Sequenz eine Zielsteuerungssequenz zum Peroxisom befinden könnte.

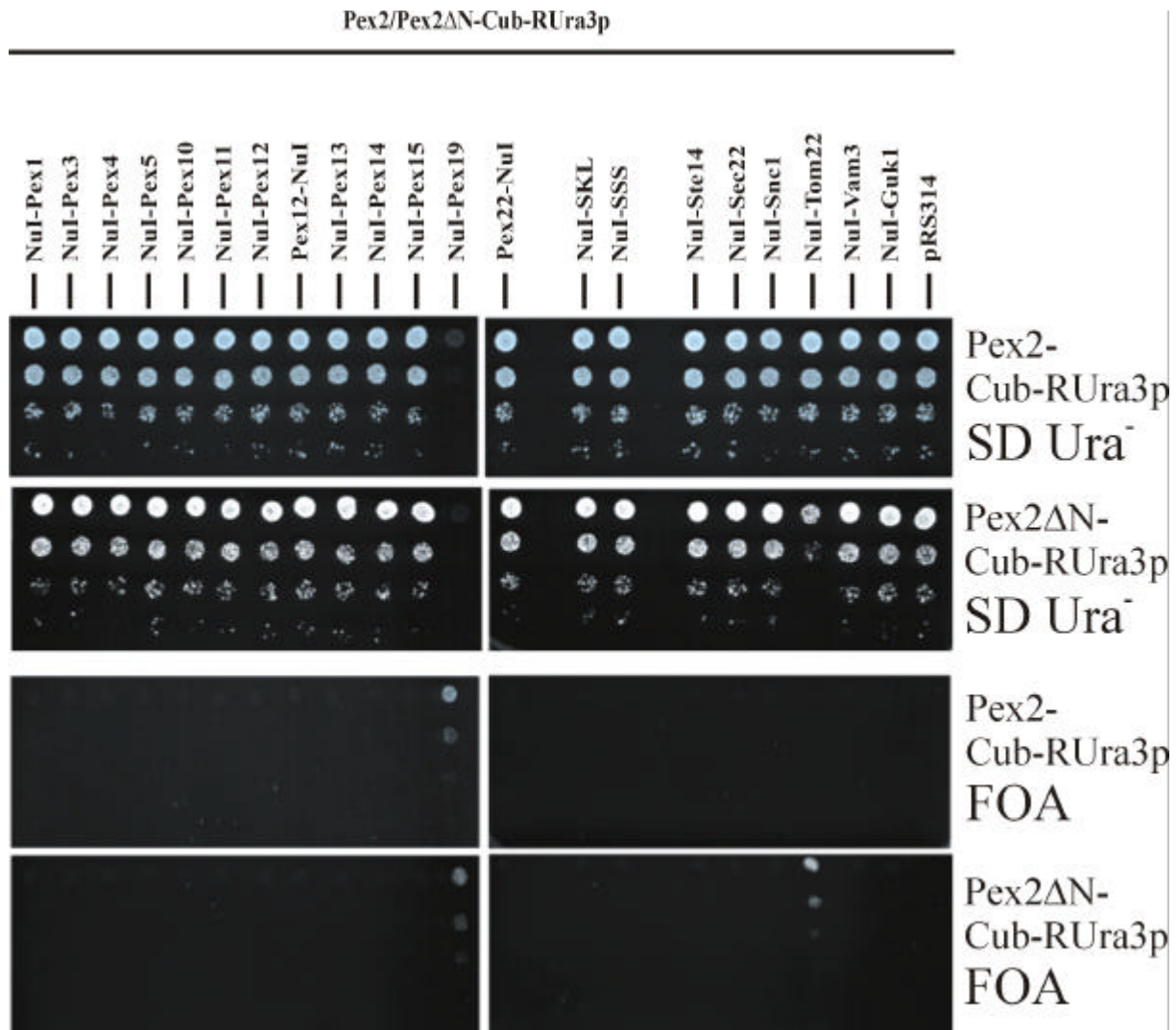


Abb. 3.27: Pex2-Cub-RUra3p interagiert nur mit dem NuI-Fusionsprotein von Pex19p, während Pex2ΔN-Cub-RUra3p mit NuI-Pex19 und NuI-Tom22 interagiert.

Zellen von JD53, die Pex2-Cub-RUra3p bzw. Pex2ΔN-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (0 μM Met) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (0 μM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Um diese Hypothese zu testen, sollte mittels des Split-Ub-Verfahrens das Interaktionsmuster von Pex2p mit dem eines N-terminal verkürzten Pex2ΔNp verglichen werden. In der Tat konnte sowohl im Ura⁻- als auch im FOA-Test eine Interaktion von Pex2-Cub-RUra3p mit NuI-Pex19 und von Pex2ΔN-Cub-RUra3p mit NuI-Pex19 und NuI-Tom22 beobachtet werden (Abb. 3.27). Der Verlust der N-terminalen 46 Aminosäuren scheint demnach einen substanziellen Teil des Proteins zum Mitochondrium zu leiten. Es ist allerdings auch bei anderen Proteinen zu beobachten, dass nicht- oder nur teilweise funktionelle Fusionsproteine zur mitochondrialen Membran gelangen. Somit konnte zwar die Hypothese bestätigt werden, doch bleibt die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung offen.

3.5.2 Untersuchungen zur Interaktion von Pex11p

3.5.2.1 Dimerisiert Pex11p auch in Abwesenheit der peroxisomalen Membran?

Pex11p besitzt vermutlich zwei Transmembransequenzen (Erdmann und Blobel, 1995). Im Unterschied zu Membranproteinen anderer Organellen kann bei PMP die Frage gestellt werden, ob die Membran des Peroxisoms eine Voraussetzung für die korrekte Faltung und die Bindung an andere Proteine ist. Dazu wurde die Interaktion zwischen NuI-Pex11 und Pex11-Cub-RUra3p in Zellen getestet, denen Pex3p und somit die peroxisomale Membran fehlte (JD53- Δ pex3). Zum ersten Mal ist hier auch der Einsatz der Nub-Mutanten NuA und NuG gezeigt, da bei allen anderen Interaktionen nur die NuI-Fusionsproteine zu einem auswertbaren Interaktionssignal führten.

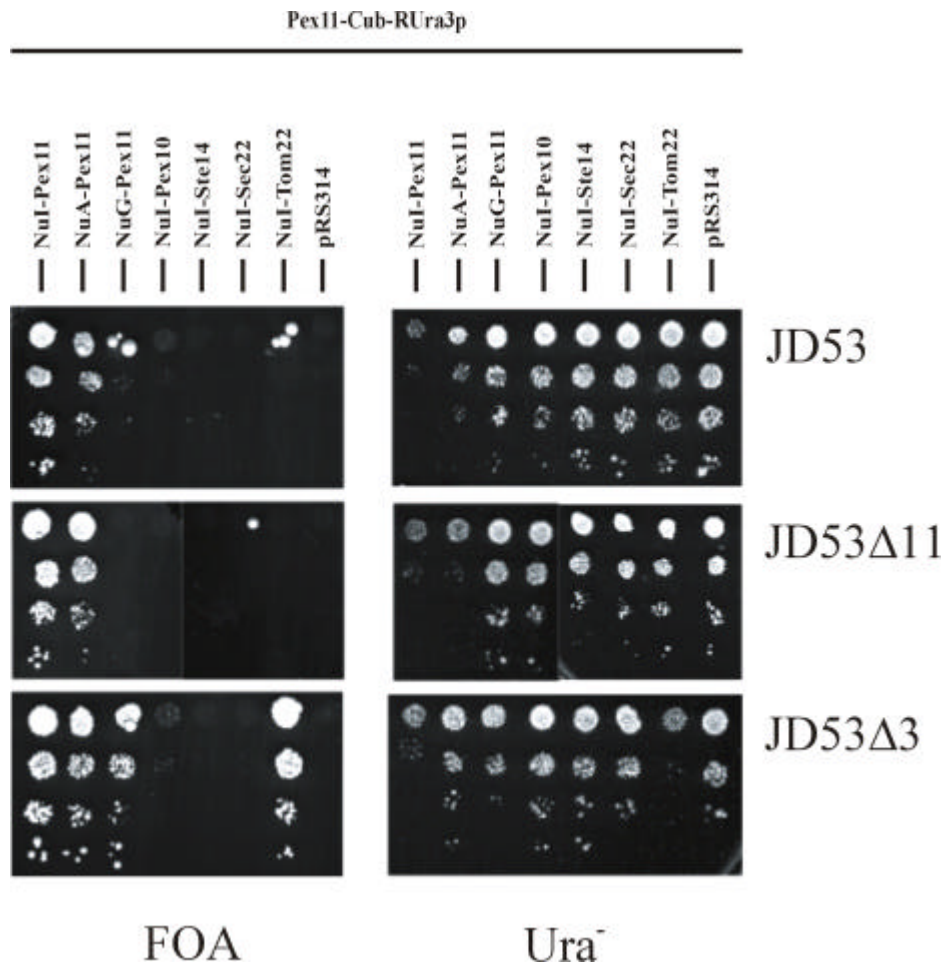


Abb. 3.28: Pex11-Cub-RUra3p interagiert mit NuI-Pex11 nicht nur in WT-Zellen, sondern auch in JD53- Δ pex11 und JD53- Δ pex3-Zellen. Die Deletion des genomischen *PEX11* hat keine messbaren Auswirkungen auf die Pex11p-Interaktionen. Die Deletion der peroxisomalen Membran in *pex3*-Zellen führt aber offensichtlich zu einer insgesamt etwas geringeren Menge von Pex11-Cub-RUra3p und zur Fehllokalisierung zum Mitochondrium. JD53-Zellen (oben), JD53- Δ pex11 (mittig) oder JD53- Δ pex3 (unten), die Pex11-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen Nub-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (250 μ M Met) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (500 μ M Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Beim direkten Vergleich der Interaktionen der beiden Pex11-Fusionsproteine miteinander in WT und $\Delta pex3$ -Zellen fällt auf, dass die Interaktion zwischen Nub-Pex11 und Pex11-Cub-RUra3p immer noch eindeutig dokumentiert werden kann. Im $\Delta pex3$ -Stamm kommt es zusätzlich zu einer Interaktion zwischen Pex11-Cub-RUra3p und NuI-Tom22. Die einfachste Interpretation dieses Resultats ist, dass Pex11p in Abwesenheit der peroxisomalen Membran in die mitochondriale Membran integriert wird und auch hier dimerisieren kann. Dieses Ergebnis bestätigt und vertieft die Arbeiten von Okumoto *et al.* (1998) und South *et al.* (2000). Das Interaktionssignal zwischen NuG-Pex11 und Pex11-Cub-RUra3p, das nur in $\Delta pex3$ -Zellen detektiert wird, weist vermutlich auf eine in diesem Stamm reduzierte Menge an Pex11-Cub-RUra3p hin.

Das gleiche Experiment wurde auch in $\Delta pex11$ -Zellen durchgeführt. Im FOA-Test ist kein Unterschied zum WT zu erkennen, doch scheint NuA-Pex11 im SD Ura⁻-Test in $\Delta pex11$ -Zellen etwas stärker mit Pex11-Cub-RUra3p zu interagieren. Dieser Effekt ist allerdings sehr gering. Eine Kompetition des nativ exprimierten Pex11p mit dem Nub-modifizierten Pex11p um Pex11-Cub-RUra3p ist, wenn überhaupt, mit diesem Experiment nur schwach nachzuweisen. Die Überexpression von zusätzlichem, nicht Nub-modifizierten Pex11-ha von einem weiteren Plasmid (pEW159) führte zu keinem zusätzlichen Kompetitionseffekt (nicht gezeigt).

3.5.3 Visualisation der Dimerisation von Pex11p in der lebenden Zelle

Da Pex11p auch in Abwesenheit peroxisomaler Membranen interagiert, war es wichtig zu zeigen, dass diese Interaktion in Wildtyp-Zellen tatsächlich an der peroxisomalen Membran stattfindet. Hierzu wurde die von N. Lehming zur Verfügung gestellte CUB-RGFP-Kassette verwendet. Anstelle des Ura3p tritt bei den von solchen Kassetten exprimierten Proteinen das GFP, also das Grün Fluoreszierende Protein, das analog zu Ura3p mit einem N-terminalen Argininrest versehen wurde und nach Abspaltung vom Cub ebenfalls sehr rasch abgebaut wird (Laser *et al.*, 2000).

JD53-Zellen, die Pex11-Cub-RGFP mit NuI-Pex11, NuI-Pex10 oder dem Leerplasmid pRS314 koexprimierten, wurden in der Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 3.29). In den Zellen, die das Leerplasmid tragen (Abb. 3.29 oben) ist deutlich sichtbar, dass in der großen Mehrzahl der Zellen (>90 %) kreisrunde Organellen durch grüne Fluoreszenz markiert werden. Da eine sehr ähnliche Färbung durch die Expression des GFP-SKL hervorgerufen

wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den hier angefärbten Kompartimenten tatsächlich um Peroxisomen handelt.

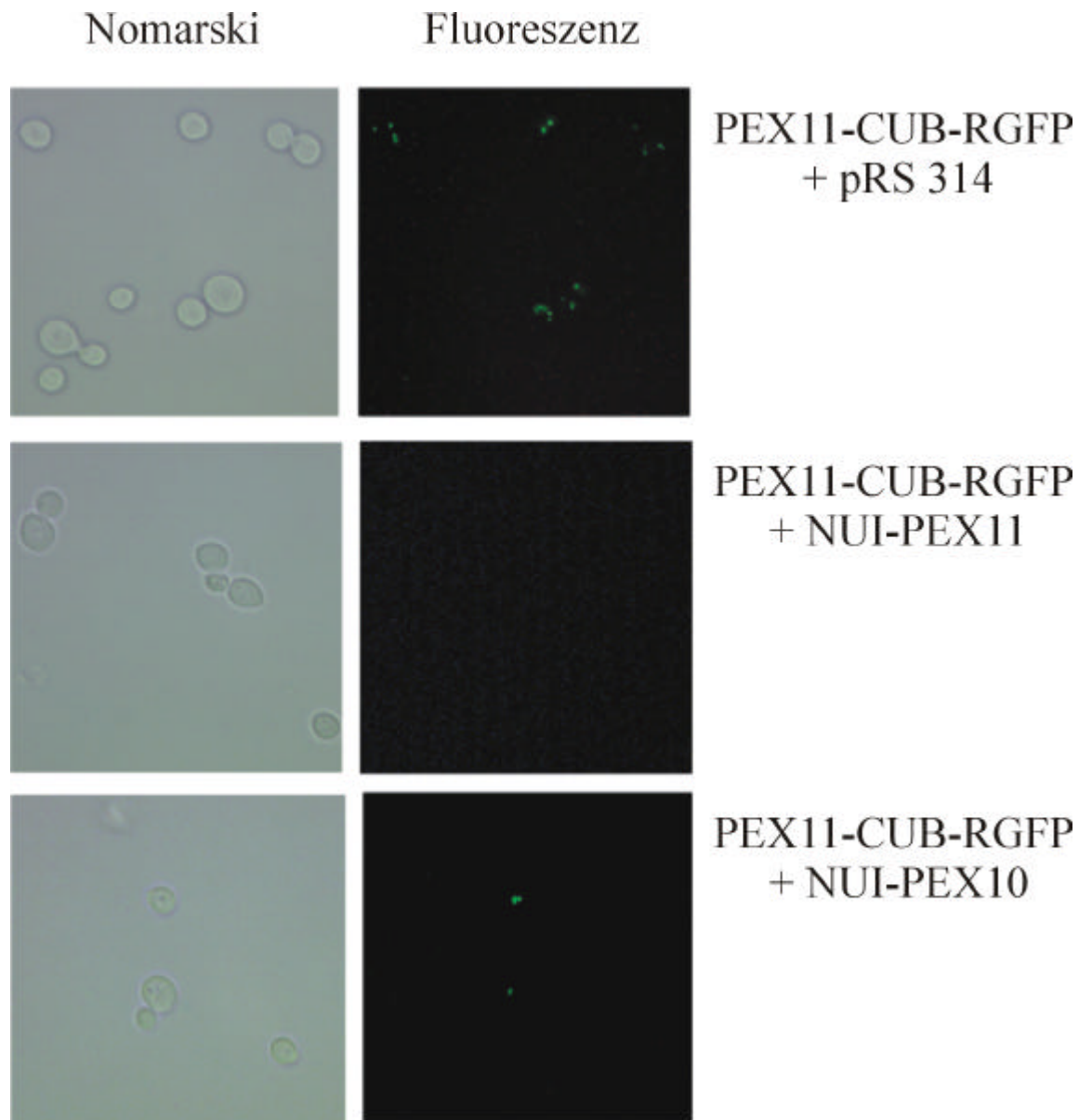


Abb. 3.29: Die Dimerisation von Pex11p kann durch Split-Up in der lebenden Zelle visualisiert werden.

Zellen von JD53, die Pex11-Cub-RGFP mit NuI-Pex11, NuI-Pex10 oder dem Leerplasmid pRS314 koexprimierten, wurden nach 48-stündiger Anzucht auf 0,3% -Glukose-Medium, das auf die Anwesenheit der Plasmide selektierte und maximale Expression durch 0 μ M Met bzw. 100 μ M CuSO₄ stimulierte, in 20% Glycerol suspendiert und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Um cytotoxische Effekte auszuschließen, wurden die Zellen auch auf entsprechenden SD-Medien ausgestrichen (nicht gezeigt).

Wird NuI-Pex11 jedoch mit Pex11-Cub-RGFP koexprimiert, so lässt sich in den Zellen keine Fluoreszenz mehr beobachten (Abb. 3.29 mittig). Wird das nicht mit Pex11-Fusionsproteinen interagierende NuI-Pex10 mit Pex11-Cub-RGFP koexprimiert, so ist wiederum eine Fluoreszenzfärbung der Peroxisomen zu beobachten, wenngleich die Fluoreszenzwirkung teilweise weniger intensiv erscheint und in einem etwas geringeren Teil (ca. 80 %) der Zellen

auftritt (Abb. 3.29 unten). Möglicherweise entspringt diese etwas verminderte Fluoreszenzintensität der Kolo-kalisation von Pex11-Cub-RGFP und NuI-Pex10 in der peroxisomalen Membran. Durch den Einsatz des Cub-RGFP-Fusionsproteins ist es also möglich, die Interaktion zweier PMP *in vivo* sichtbar zu machen.

3.5.4 Ist die Interaktion von NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p von Pex22p abhängig?

Im Split-Ub-Test hatten NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p eine erhöhte räumliche Nähe zueinander aufgewiesen, die auch durch die in Abb. 3.21 gezeigten Ergebnisse einer Koimmunopräzipitation bestätigt worden waren. Da Koller *et al.* (1999) beschrieben hatten, dass Pex22p vermutlich Pex4p an die peroxisomale Membran rekrutiert und dieses auch durch die Ergebnisse des Split-Ub-Tests bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p von der Anwesenheit des endogenen Pex22p abhängt. Pex10-Cub-RUra3p wurde in WT-, $\Delta pex5$ - und $\Delta pex22$ -Zellen jeweils mit einem Nub-Fusionsprotein koexprimiert und deren Interaktionen miteinander in Wachstumstests ermittelt. Der Vergleich zwischen WT und $\Delta pex22$ -Zellen (Abb. 3.30) zeigt, dass sich nur die Interaktion zwischen NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p messbar verändert und in $\Delta pex22$ -Zellen nicht mehr gemessen wird. Das zu den WT-Zellen unveränderte Interaktionsprofil in $\Delta pex5$ -Zellen belegt, dass dieser Effekt spezifisch für den Ausfall des Pex22p ist. Die Interaktion zwischen Pex4p und Pex10p hängt also direkt von der Anwesenheit des Pex22p ab.

Koller *et al.* (1999) beschrieben jedoch auch, dass in $pex22$ -Deletionsstämmen Pex4p in deutlich niedrigeren Mengen vorliegt als in WT-Zellen. Es wäre somit denkbar, dass das in Abb. 3.30 gezeigte Ergebnis nur das Resultat einer stark verminderten Konzentration von NuI-Pex4 ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde Pex4-Cub-RUra3p mit NuI-Pex4 bzw. einem Leerplasmid pRS314 in JD53- und in JD53- $\Delta pex22$ -Zellen koexprimiert und diese Zellen gegeneinander im Wachstumstest verglichen. Abb. 3.31 zeigt, dass die Pex4-Cub-RUra3p-Aktivität in beiden Zellen ähnlich stark ist. Würden auch Fusionsproteine von Pex4p rasch abgebaut, so wäre zu erwarten, dass die mit pRS314 transformierten JD53- $\Delta pex22$ -Zellen auf FOA wachsen könnten, weil kein Ura3p in den Zellen vorliegt. Würde andererseits selektiv nur NuI-Pex4 abgebaut, käme es nicht zum positiven Interaktionssignal in den $\Delta pex22$ -Zellen. Somit kann das Ergebnis, wonach Pex22p der Faktor ist, der Pex4p zur Membran und zu Pex10p rekrutiert, als spezifisch betrachtet werden.

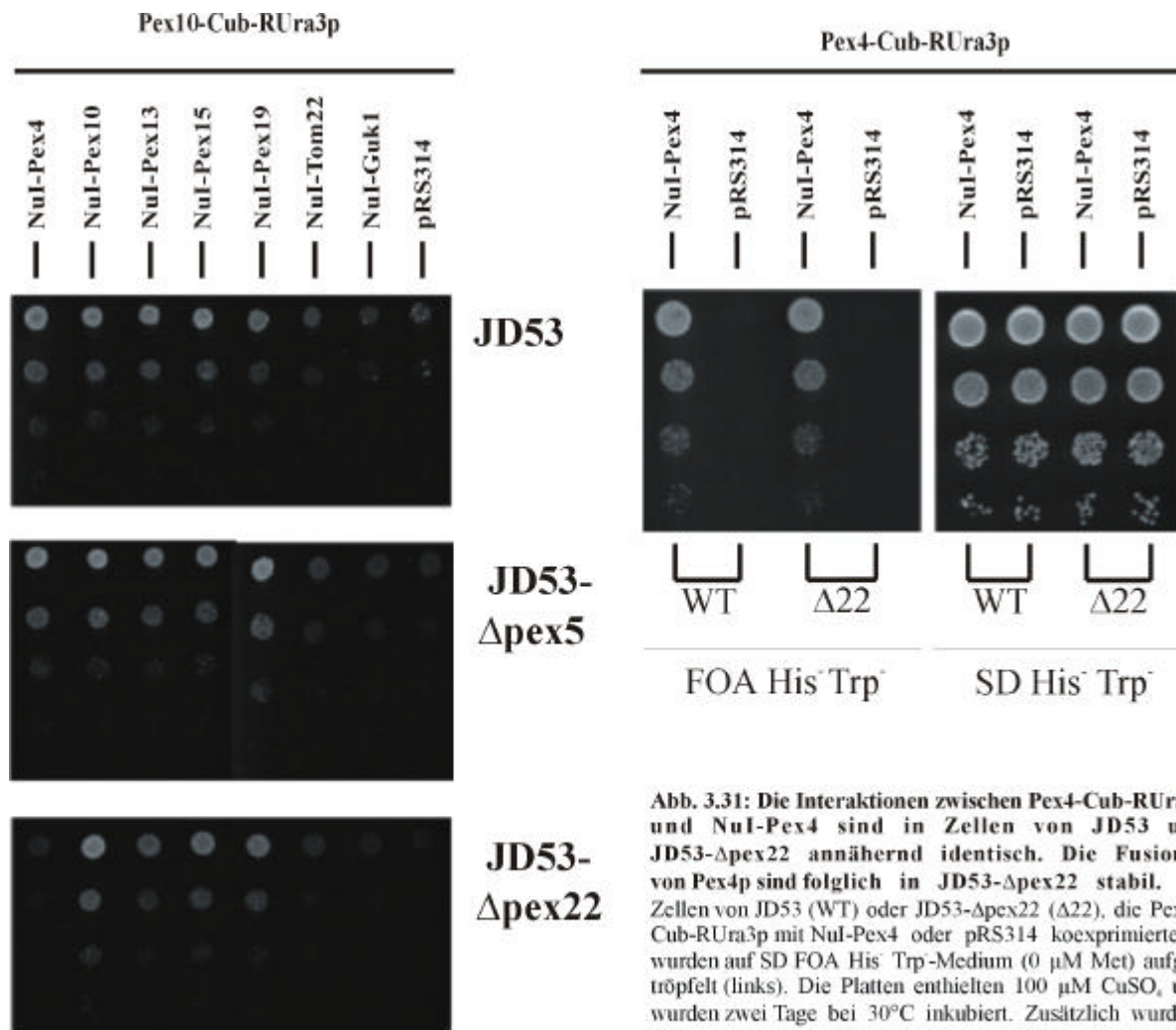


Abb. 3.31: Die Interaktionen zwischen Pex4-Cub-RUra3p und NuI-Pex4 sind in Zellen von JD53 und JD53- Δ pex22 annähernd identisch. Die Fusionen von Pex4p sind folglich in JD53- Δ pex22 stabil. Zellen von JD53 (WT) oder JD53- Δ pex22 (Δ 22), die Pex4-Cub-RUra3p mit NuI-Pex4 oder pRS314 koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (0 μ M Met) aufgetropft (links). Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (rechts).

Abb. 3.30: Die Interaktion zwischen NuI-Pex4 und Pex10-Cub-RUra3p ist von der Anwesenheit des endogenen Pex22p abhängig.

Zellen von JD53 (oben), JD53- Δ pex5 (mittig) oder JD53- Δ pex22 (unten), die Pex10-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (12,5 μ M Met; nicht gezeigt) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (12,5 μ M Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

3.5.5 Kann die Reihenfolge von Bindungsereignissen von Pex5p an seine Rezeptoren in der peroxisomalen Membran mittels Split-Ub detektiert werden?

Pex5p spielt als Rezeptor für das PTS1 eine wichtige Rolle im Import peroxisomaler Membranproteine und gehört zu den bereits intensiv untersuchten Peroxinen. Eine Reihe von Bindungspartnern von Pex5p sind bereits charakterisiert worden (Erdmann und Blobel, 1996; Elgersma *et al.*, 1996; Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997, Chang *et al.*, 1999). NuI-Pex5 und Pex5-Cub-RUra3p sind beide nicht funktionell und die Split-Ub-Versuche mit Fusionsproteinen von Pex5p ergaben zunächst wenig Aufschluss. Zwar konnte in Ura⁻

Wachstumstests die Interaktion von NuI-Pex5 mit Pex13-Cub-RUra3p und Pex14-Cub-RUra3p detektiert werden (nicht gezeigt), jedoch nicht spiegelbildlich im FOA-Wachstumstest. Die späteren Bindungen von Pex5p an Pex10p und Pex12p konnten gar nicht detektiert werden konnten. Der FOA-Wachstumstest von Zellen, die die verschiedenen NuI-Fusionsproteine mit Pex5-Cub-RUra3p koexprimierten, zeigte nur für NuI-Pex5 und schwächer für NuI-Pex19 ein Wachstumssignal (Abb. 3.32). Offenbar trifft die für das humane Pex5p postulierte Tetramerisierung auch auf das Hefeprotein zu. Bei längerer Inkubation der Platten (96 h) wurde auch mit NuI-Pex13 ein Signal sichtbar; äußerst schwaches Wachstum war nach 5 Tagen bei 30°C auch bei NuI-Pex1 zu beobachten, doch war der Effekt marginal und kaum dokumentierbar.

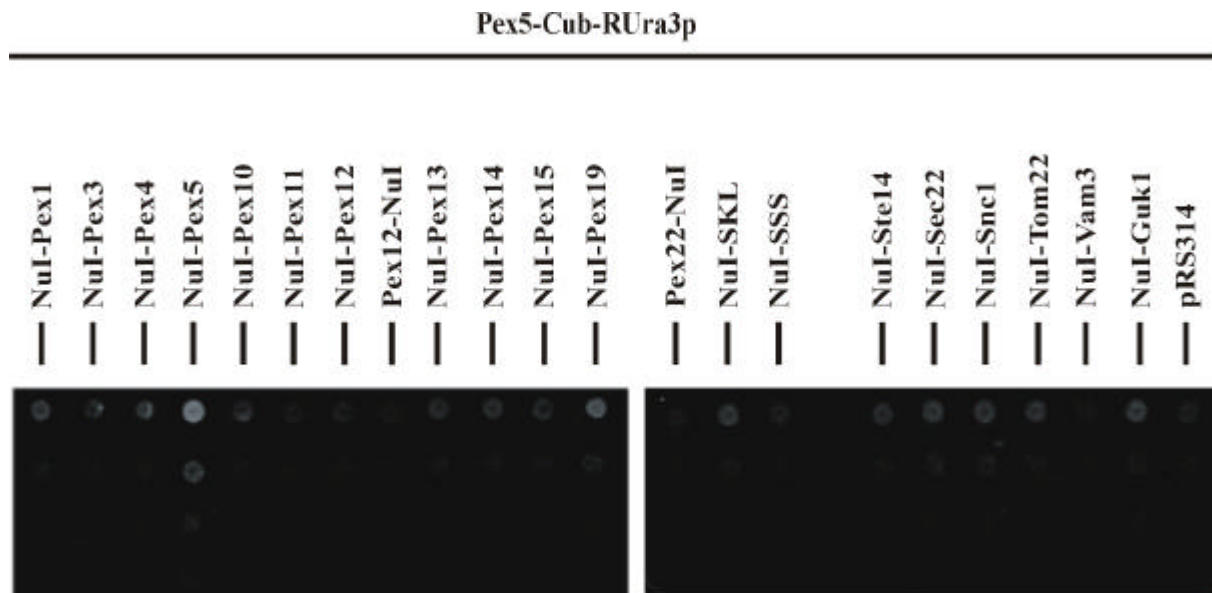


Abb. 3.32: Pex5-Cub-RUra3p interagiert mit NuI-Pex5 und NuI-Pex19, detektiert aber nicht die transienten Interaktionen mit den peroxisomalen PMP.

Zellen von JD53, die Pex5-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium 0 μ M Met und SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium 0 μ M Met (nicht gezeigt) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μ M CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

Einen Hinweis auf die Interaktion zwischen einem Pex5p-Fusionsprotein und einem PMP der Importkaskade lieferten die Wachstumstests von Pex12-Cub-RUra3p (vgl. 3.3.1.1). Ließ man die FOA-Tests sehr lange inkubieren (5 Tage bei 30°C), so wurde mit NuI-Pex5 ein sehr schwaches und kaum dokumentierbares Signal sichtbar (nicht gezeigt). Um dieses doch noch darstellen zu können und um möglicherweise Untersuchungen zur Reihenfolge bestimmter Bindungsereignisse von NuI-Pex5 zu ermöglichen, wurde Pex12-Cub-RUra3p in verschiedenen Deletionsstämmen gegen NuI-Pex5 getestet. Dabei war die Idee, dass ein verstärktes Signal immer dann beobachtet werden sollte, wenn entweder ein kompetierendes

Protein (Pex12p in JD53- Δ pex12) oder ein zeitlich später bindendes Protein deletiert wird; und somit NuI-Pex5 nicht weitergeleitet und an Pex12-Cub-RUra3p angestaut würde. Zellen von JD53, JD53- Δ pex4, JD53- Δ pex10, JD53- Δ pex12, JD53- Δ pex13 und JD53- Δ pex17 wurden mit Pex12-Cub-RUra3-PMet-pRS313 und mit dem Leerplasmid pRS314 bzw. Plasmiden, von denen NuI-Pex5, NuI-Pex10 oder NuI-Pex19 exprimiert wurden, kotransformiert.

In JD53- Δ pex4- und JD53- Δ pex10-Zellen konnten im FOA-Test ein leicht erhöhtes Wachstumssignal der Zellen, die NuI-Pex5 und Pex12-Cub-RUra3p koexprimieren, beobachtet werden (nicht gezeigt). Dieses reproduzierbare, aber nicht sehr deutliche Signal wird als Anstau des NuI-Pex5 am Bindungspartner Pex12-Cub-RUra3p in Folge des Wegfalls eines späteren Bindungspartners gedeutet. Demzufolge würden Pex4p und Pex10p später mit Pex5p kommunizieren als Pex12p. Umgekehrt ist die schwache Reaktion in WT-Zellen, in denen *PEX13* bzw. *PEX17* deletiert wurden, überhaupt nicht mehr nachzuweisen. Pex13p und Pex17p wirken also in der Pex5p-Interaktionskaskade vor Pex12p. Diese Interpretation bestätigte die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Das Experiment zeigt zwar, dass die Split-Ub Methode generell geeignet ist, um die Reihenfolge sequenzieller Proteininteraktionen in einer solchen Kaskade zu untersuchen, doch konnten die experimentellen Bedingungen noch nicht für eine optimale Auflösung der Interaktion zwischen Pex12-CubRUra3p und NuI-Pex5 im WT und den Deletionsstämmen eingestellt werden.

3.6 Anwendungen

3.6.2 Lokalisation von Proteinen in der lebenden Zelle am Beispiel von Ady2p

In den vergangenen Jahren ist die Zahl gut charakterisierter Nub-Markerproteine in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle beständig gewachsen. So konnten Wittke *et al.* (1999) bereits zeigen, dass ein mit Cub markiertes Testprotein spezifisch mit den Nub-Proteinen im gleichen Kompartiment, nicht aber mit denen anderer Kompartimente der Zelle interagiert.

In einer Studie zur Charakterisierung zellulärer Antwortmechanismen auf mitochondriale Fehlfunktionen fanden Epstein *et al.* (2001) heraus, dass neben einigen für peroxisomale Proteine kodierenden Genen die Transkription des offenen Leserasters YCR010C erhöht wird. Dieses auch als *ADY2* bezeichnete Gen erwies sich weiterhin als durch Ölsäure induzierbar, was die Vermutung nahe legte, dass es sich bei Ady2 um ein peroxisomales Protein handeln

könnte. Ady2p besteht aus 283 Aminosäuren und ist mit hoher Sicherheit ein Transmembranprotein (sechs putative TMD). Die Funktion von Ady2p ist nicht bekannt.

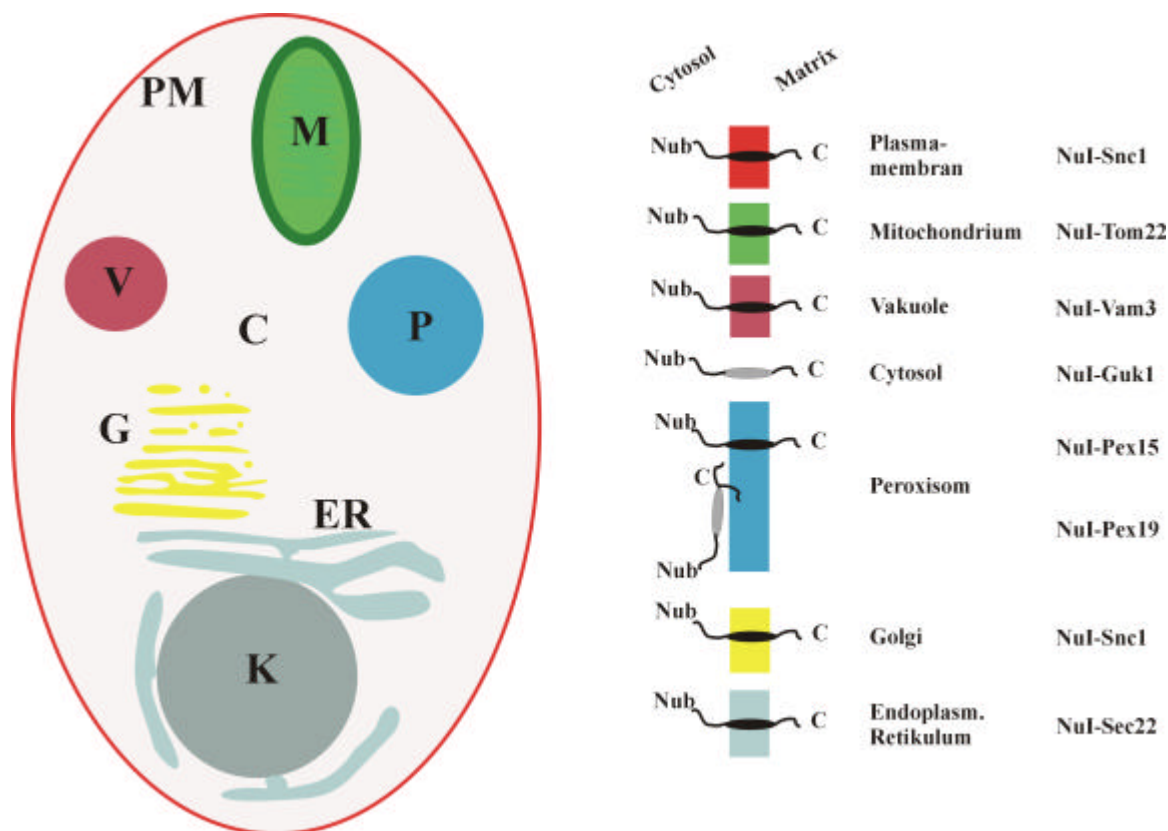


Abb. 3.33: Schematische Übersicht der Nub-Testproteine, die für die Lokalisationsbestimmung von Ady2p verwendet wurden. Links sind die Kompartimente der Zelle gezeigt (C = Cytosol, ER = Endoplasmatisches Retikulum, G = Golgi, K = Kern, M = Mitochondrium, P = Peroxisom, PM = Plasmamembran, V = Vakuole). Rechts sind die NuI-Fusionsproteine, ihre Orientierung in der Membran und das jeweilige Kompartiment angegeben.

Das Split-Ub Verfahren sollte nunmehr dazu verwendet werden, um die Lokalisation von Ady2p zu untersuchen. Hierzu wurde das Fusionsprotein Ady2-Cub-RUra3p in Zellen mit verschiedenen Nub-Markerproteinen oder dem Leervektor pRS314 koexprimiert. Eine Übersicht über die verwendeten Nub-Markerproteine und ihre Lokalisation gibt Abb. 3.33 wieder.

Der in Abb. 3.34 gezeigte Wachstumstest zeigt eine deutliche Interaktion von Ady2-Cub-RUra3p mit NuI-Sec22 auf Ura⁻- wie FOA-Medien. Eine Nähe zu den Markerproteinen des Peroxisoms ist dabei nicht festzustellen, jedoch zeigt sich im FOA-Test auch ein schwaches Signal in Zellen, die NuI-Snc1 mit dem Ady2-Fusionsprotein koexprimieren. Es kann daher vermutet werden, dass Ady2p nach oder während seiner Synthese in die ER-Membran integriert wird und diese anschließend über den sekretorischen Weg via Golgi zur

Plasmamembran verlässt. Da NuI-Pex19 bisher mit allen Cub-RUra3p-markierten PMP im FOA-Test interagiert, nicht aber mit Ady2-Cub-RUra3p, handelt es sich bei Ady2p wohl nicht um ein peroxisomales Membranprotein.

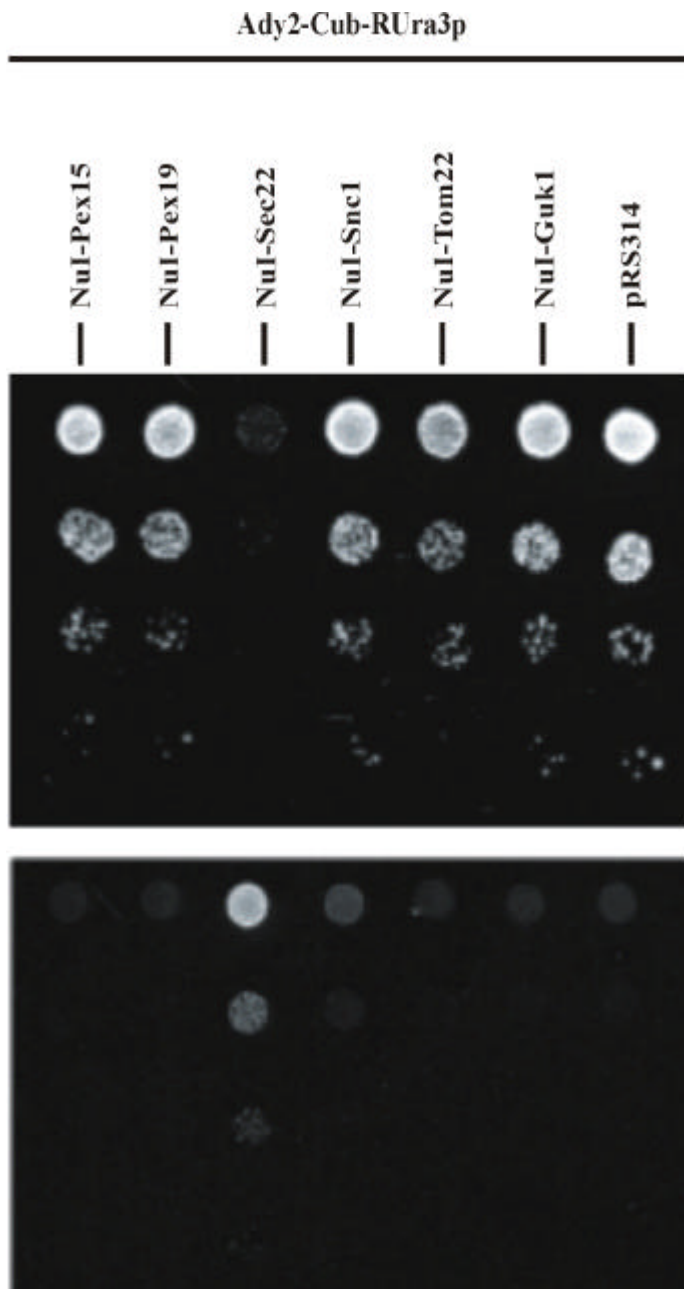


Abb. 3.34: Ady2-Cub-RUra3p interagiert mit NuI-Sec22 und schwach mit NuI-Snc1, aber nicht mit NuI-Pex15 oder -Pex19.

WT-Zellen (JD53), die Ady2-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder dem Leervektor pRS314 koexprimierten, wurden auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (50 µM Met) und SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (100 µM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 µM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium aufgetropft, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen (nicht gezeigt).

3.6.3 Suche nach Bindungspartnern von Proteinen

3.6.3.1 Rational des Split-Ub-Verfahrens zur Suche nach Bindungspartnern

Die Suche nach Bindungspartnern eines bestimmten Proteins („Screening“) sollte mittels des Split-Ubiquitin Verfahrens ebenfalls möglich sein. Wie Abb. 3.35 schematisch verdeutlicht, wird hierfür zunächst das Gen, dessen Interaktionspartner identifiziert werden sollen (Zielgen) als CUB-RURA3-Fusionsgen in einem Plasmidvektor dargestellt (1). Dieser wird in Hefezel-

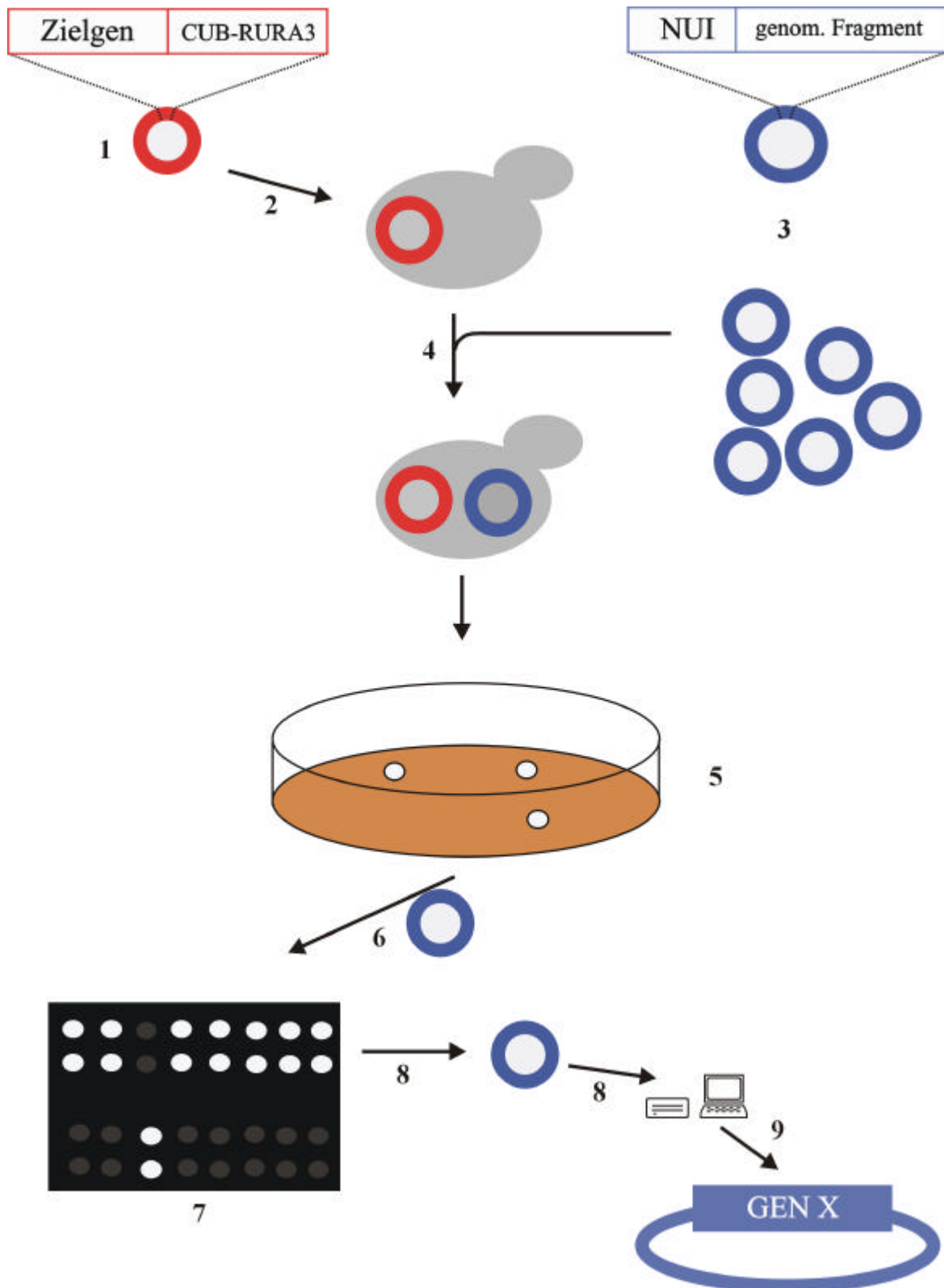


Abb. 3.35: Schematische Darstellung der Split-Ub basierten Suche nach Interaktionspartnern von Proteinen. Nähere Erläuterungen im Text (3.6.3.1).

len transformiert (2). Eine Nub-Fusionsgenbank (3) wird nun in die Zellen transformiert, die das das Zielprotein-Cub-RUra3p kodierende Plasmid bereits enthalten (4). Diese NUB-Fusionsgenbank besteht aus DNS-Fragmenten des Genoms der Hefe, die an das 3'-Ende der

für das Nub kodierenden Sequenz fusioniert wurden. Die Selektion solcher Doppeltransformanten auf FOA-haltigen Medien erlaubt die Identifizierung von Nub-Fusionskonstrukten, die mit dem Cub-Konstrukt interagieren (5). Aus den Kolonien von Doppeltransformanten, die auf FOA wachsen, wird dann das NUB-tragende Plasmid isoliert (6). Um einen größtmöglichen Teil an falsch-positiven Klonen auszuschalten, werden die gewonnenen NUB-Plasmide dann in frische Zellen, die das Zielgen-CUB-RURA3-Plasmid enthalten, transformiert. Diese Zellen werden dann in Ura⁻- und FOA-Wachstumstests eingesetzt (7). Durch die Retransformation in die Ausgangszellen sollen solche Klone aussortiert werden, deren FOA-Resistenz auf zellulären Spontanmutationen (etwa von Transporterproteinen) beruht. Gleichzeitig wird die Möglichkeit spontaner Veränderungen im Zielgen-CUB-RURA3-Plasmid ausgeschlossen.

Durch die Koexpression der Nub-Proteine mit Cub-RUra3p-Fusionsproteinen, die mit der Aktivität und Lokalisation des ursprünglichen Zielgens nicht überlappen, sollten zu hoch exprimierte Nub-Fusionen, die unspezifisch mit Cub reagieren, aussortiert werden (7). NUB-Plasmide, die in diesen Siebverfahren positiv getestet wurden, werden amplifiziert, aufgereinigt, sequenziert und anschließend das Gen durch Suche im *Saccharomyces cerevisiae* Genom identifiziert (8). Das Gen kann anschließend zur eingehenden Charakterisierung der Interaktion dargestellt werden (9).

Anders als die „klassische“ Two-Hybrid-Methode lässt das Split-Ubiquitin-Verfahren grundsätzlich auch Membranproteine und Transkriptionsfaktoren als Zielproteine zu. Auf diese Weise konnten bisher unbekannte Interaktionspartner des Transkriptionsaktivators Gal4p und des generellen Transkriptionsrepressors Tup1p identifiziert werden (Laser *et al.*, 2000; Gromöller und Lehming, 2000).

3.6.3.2 Das Zielprotein Pex3-Cub-RUra3p

Als Zielprotein für diesen Screen sollte ein Protein gewählt werden, über dessen Interaktionspartner noch sehr wenig bekannt ist und das in der Zelle vergleichsweise stabil exprimiert wird. Von allen in *S. cerevisiae* beschriebenen Peroxinen weist eine Deletion von *PEX3* den schwersten Phänotyp auf. Verschiedene Quellen berichten übereinstimmend, dass in diesen Zellen nicht einmal Reststrukturen peroxisomaler Membranen („peroxisomal remnants“ oder „ghosts“) vorhanden sind, wie sie für die übrigen *pex*-Stämme (mit Einschränkungen für *pex19*) beschrieben wurden. Pex3p scheint also, wie eingangs diskutiert, zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Biogenese der peroxisomalen Membran eine Aufgabe zu

besitzen. Damit sollte die Identifizierung der Interaktionspartner von Pex3p auch zur Aufklärung der peroxisomalen Biogenese beitragen.

Zunächst wurde Pex3-Cub-RUra3p in den Wachstumstests charakterisiert (Abb. 3.36). Die stärkste Interaktion war mit NuI-Pex15 zu beobachten, gefolgt von NuI-Pex13. Alle weiteren schwachen Interaktionen mit einzelnen Peroxinen (NuI-Pex10, -Pex11, -Pex12, -Pex13 und -Pex19) dürften bereits im Bereich der Hintergrundaktivität liegen, da sie vergleichbar mit der Interaktion von NuI-Sec22 waren. Das Expressionsniveau des Pex3-Cub-RUra3p-Fusionsproteins lag ebenfalls so hoch, dass eine große Zahl von falsch-positiven Klonen aufgrund einer schwachen FOA-Sensitivität nicht zu befürchten stand. Die in Abb. 3.36 gezeigten Wachstumstests wurden bei einer Methioninkonzentration von 200 μM durchgeführt. Somit blieb genügend Spielraum für stringenteren Bedingungen bei der Reihentestung mit der NUI-Fusionsgenbank.

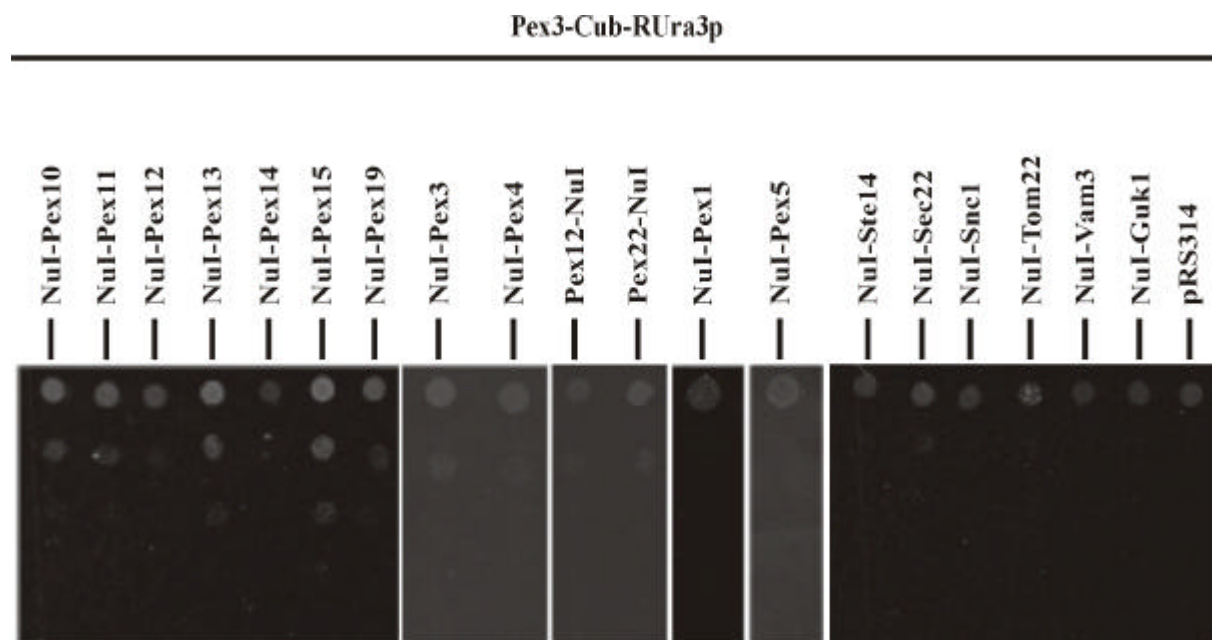


Abb. 3.36: Pex3-Cub-RUra3p interagiert mit den NuI-Fusionsproteinen von Pex15p und Pex13p.

Zellen von JD53, die Pex3-Cub-RUra3p mit dem jeweiligen angegebenen NuI-Fusionsprotein oder einem Leervektor koexprimierten, wurden auf SD FOA His⁻ Trp⁻-Medium (200 μM Met) aufgetropft. Die Platten enthielten 100 μM CuSO₄ und wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Der korrespondierende Wachstumstest auf SD His⁻ Trp⁻ Ura⁻-Medium (150 μM Met) ist nicht gezeigt ebenso wie die Auftragung der Zellen auf SD His⁻ Trp⁻-Medium, um die gleichmäßige Verdünnung und Auftragung zu überprüfen.

3.6.3.3 Ergebnisse und Fehleranalyse

Zunächst wurde eine Versuchsreihe mit der NUI-Fusionsgenbank, mit der Laser *et al.* (2000) und Gromöller *et al.* (2000) erfolgreich Bindungspartner von Transkriptionsfaktoren

identifiziert hatten, durchgeführt (von N. Lehming zur Verfügung gestellt). Zwei Runden von Transformationen erbrachten nur jeweils 5 bzw. 8 Kolonien bei jeweils geschätzten 10^6 Transformanten, die als nicht-plasmidgebundene FOA-Resistenzen identifiziert wurden. Der Grund für das Fehlen positiver Klone wird in der geringen durchschnittlichen Größe der hinter NUB klonierten Fragmente genomischer DNS (100 – 200 bp) vermutet. Mag diese Größe auch für lösliche Proteine wie Transkriptionsfaktoren ausreichend gewesen sein, um Bindedomänen zu identifizieren, so scheinen für die Analyse von Membranproteinen, bei denen das Nub-Fusionsprotein Zielsteuerungs- und Membransequenzen sowie die Bindedomäne enthalten muss, doch längere Fusionskonstrukte erforderlich zu sein.

In einem weiteren Experiment wurde eine entsprechend verbesserte NUI-Fusionsgenbank eingesetzt (von C. Reichel zur Verfügung gestellt), in deren Vektoren hinter das NUI-Modul 1-2 kb große Fragmente der genomischen DNS des Hefestammes DF5 inseriert waren. In jedem Leserahmen waren 10^6 Klone hergestellt worden, die das Genom der Hefe sehr gut abdecken sollten (pers. Kommunikation mit C. Reichel und eigene Kontrollen der Insertgröße; nicht gezeigt). Es wurden Zellen von JD53, die das Plasmid Pex3-Cub-RUra3-PMet-pRS313 trugen, mittels eines leicht modifizierten Protokolls mit dieser NUI-Fusionsgenbank transformiert. Nach vier Tagen waren auf den Platten der mit H₂O transformierten Zellen keine, auf denen der mit pRS315 transformierten 6 Kolonien gewachsen. Die Transformantenzahl pro Ansatz mit NUI-Fusionsgenbank lag bei etwa 500.000 Transformanten, so dass insgesamt $3,5 \times 10^6$ Transformanten eingesetzt wurden.

Auf den FOA-Platten wurden insgesamt 249 Kolonien gezählt, von denen 248 nach Umstreichen auf SD His⁻ Leu⁻-Medium wuchsen. Diese Zellen wurden auf SD His⁻ Leu⁻ Ura⁻-Medium umgestempelt, um zu überprüfen, ob eine Interaktion zwischen Nub und Cub auch durch ein entsprechendes Signal im Ura⁻-Test zu beobachten ist. 114 Klone (46 %) zeigten eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums auf Uracil-freiem Medium, 37 (14 %) ein schwaches Signal und 97 Klone (40 %) wiesen keine Wachstumsdefekte unter diesen Bedingungen auf. Somit wurden 40 % der Klone in einem ersten Sieb als falsch-positiv identifiziert.

Nach Isolierung, Retransformation und Wachstumstests auf Ura⁻- und FOA-Medium wurden insgesamt nur noch 32 Plasmide identifiziert, die für NuI-Fusionsproteine kodierten, die gegen Pex3-Cub-RUra3p ein Signal ergaben. Alle diese NuI-Fusionsproteine interagierten mit

dem als Negativkontrolle verwendeten Ste14-Cub-RUra3p nicht. Erfolgreich mit Nub sequenziert wurden somit schlussendlich 28 Nub-Konstrukte. Die Übersetzung der Sequenz zeigte, dass nur kurze Peptide von 20 - 50 Aminosäuren Länge C-terminal des NuI-ha-Proteins entstanden waren. Die Peptide stammten alle aus untranslatierten Bereichen des Hefegenoms. Es konnte somit kein einziger Interaktionspartner von Pex3-Cub-RUra3p identifiziert werden.

Auffällig war jedoch, dass bei etwa der Hälfte der an NuI-ha fusionierten Peptide ein Motiv auftauchte, dessen Konsensus als RR-(X₁₄₋₁₉)-(K/R) mit häufig einem zweiten positiven Ladungsträger unmittelbar oder eine Position weiter benachbart beschrieben werden kann. Dieses Motiv hat Ähnlichkeit mit der Sequenz vieler putativer oder identifizierter TMD von Peroxinen, die etwa 16 - 17 Aminosäuren lang sind und von jeweils zwei oder auch zwei und einem positiv geladenen Aminosäurerest flankiert werden.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Interaktionen peroxisomaler Membranproteine mit dem Split-Ubiquitin-System

Das erste wesentliche Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob es möglich ist, die Interaktion peroxisomaler Membranproteine in der lebenden Zelle zu messen. Die Interaktionsanalyse membranassoziierter Proteine wird mit den bisher verwendeten Methoden generell von zwei Einschränkungen betroffen: Erstens sind die meisten der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* wie *in vitro* für lösliche Proteine, nicht aber für Membranproteine optimiert und gestatten somit selten die Analyse des vollständigen Proteins. Zweitens setzt die zur Untersuchung in der lebenden Zelle häufig verwendete Methode der Two-Hybrid-Technik (Fields und Song, 1989) die Rekonstitution der Bindung der beiden untersuchten Proteine im Zellkern voraus. Dadurch wird oft eine Untersuchung vollständiger Transmembranproteine ebenso unmöglich wie die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen in ihrer natürlichen zellulären Umgebung.

Die von Johnsson und Varshavsky (1994a) beschriebene Split-Ubiquitin-Methode gestattet prinzipiell, die Wechselwirkungen von Proteinen *in vivo* und in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. Stagljar *et al.* (1998) und Wittke *et al.* (1999) beschrieben bereits Anwendungen der Methode zur Messung von Interaktionen zwischen Membranproteinen. In beiden Arbeiten lag der Schwerpunkt der untersuchten Proteine bei den Membranproteinen des endoplasmatischen Retikulums. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Split-Ubiquitin-Methode auch für die Untersuchung peroxisomaler Membranproteine eignet. Dies schließt die Analyse von integralen PMP wie von peripheren oder überwiegend cytosolisch lokalisierten Peroxinen ein. Wesentliche neue Interaktionen, die durch den Einsatz der Split-Ub-Methode entdeckt wurden, konnten auch durch biochemische oder zellbiologische Verfahren bestätigt werden. Um die erhaltenen Interaktionsdaten - insbesondere bei Abweichungen von bereits beschriebenen Protein-Protein-Interaktionen von Peroxinen - bewerten zu können, war die Feststellung der Funktionalität der Fusionskonstrukte sehr wesentlich. Bereits Erdmann *et al.* (1989) hatten ausgenutzt, dass *Saccharomyces cerevisiae* zum Wachstum auf Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle funktionsfähige Peroxisomen benötigt. Die Funktionalitätstests auf Ölsäure-Medien und durch den GFP-Import-Test ergaben ein zumeist deckungsgleiches, in einigen Nuancen divergierendes Bild. Besonders beim Ausbleiben einer aufgrund bekannter Daten erwarteten Interaktion (etwa zwischen NuI-Pex12 und Pex10-Cub-RUra3p) erwiesen sich die

Funktionalitätsaussagen als wertvolles Hilfsmittel in der Bewertung der eigenen Beobachtungen. Neben den Funktionalitätstests konnte auch gezeigt werden, dass das Split-Ub-System zur Messung von Interaktionen in *pex*-Deletionsstämmen eingesetzt werden kann, um so Aufschluss über die Hierarchie der gemessenen Interaktionen zu gewinnen.

4.2 Eine Split-Ub basierte Interaktionskarte der Peroxine

Mittels der Split-Ub-Methode wurden wie beschrieben und in den Tab. 3.3 und 3.4 wiedergegeben Interaktionstests von allen Peroxin-Cub-RUra3p-Fusionsproteinen gegen alle NuI-Fusionsproteine durchgeführt. Hieraus ergab sich eine Interaktionskarte der Peroxine, die aus Gründen der Übersichtlichkeit aufgeteilt auf zwei Interaktionskarten graphisch dargestellt ist (Abb. 4.1 und 4.2). Die in Abb. 4.1 abgebildeten Teile des Netzwerkes beziehen sich auf die Protein-Protein-Interaktionen des putativen Translokationskomplexes des Peroxisoms. In Abb. 4.2 sind die Interaktionen von Pex19p (Abb. 4.2A), die schwache Interaktion zwischen Pex4p und Pex5p (Abb. 4.2B), die Interaktionen von Pex11p (Abb. 4.2C) sowie die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Peroxinen und den Markern des ER graphisch wiedergegeben (Abb. 4.2D). Dabei wurde zwischen starken und schwachen Signalen unterschieden (unter schwächere Signale fielen dabei auch solche, die nur in einem Testverfahren (also FOA oder Ura^r) erfasst werden konnten). Signale, die nicht eindeutig über dem Hintergrundsignal lagen, wurden in der graphischen Darstellung nicht mit erfasst. Ebenfalls gesondert ausgewiesen wurden dabei die Interaktionen von Pex5p mit Pex12p und Pex13p, die nur durch Verwendung spezieller Verfahren (Analyse in Deletionsstämmen) befriedigend dokumentiert werden konnten. Zudem flossen die durch Analyse in Deletionsmutanten bestätigten Protein-Protein-Wechselwirkungen und die durch die alternativen Verfahren Koimmunopräzipitation und chemische Kreuzvernetzung sichtbar gemachten Interaktionen gesondert in die Übersicht ein.

Der Entscheidung, welche Fusionsproteine von welchen Peroxinen in dieser Arbeit dargestellt und im Split-Ub-Interaktionstest analysiert wurden, lagen zunächst die zur Verfügung stehenden Informationen zur Topologie der eingesetzten Membranproteine zugrunde. So wurde auf die Konstruktion der Nub- oder Cub-Fusionsproteine verzichtet, bei denen der entsprechende Terminus des nativen Proteins in die Matrix des Peroxisoms weist. In zwei Fällen, nämlich für Pex12p und Pex22p, wurde versucht, diesen topologischen Unvereinbarkeiten durch die Darstellung von C-terminalen Nub-Fusionsproteinen Rechnung zu tragen. Beide zeigten aber auch mit den allermeisten ihrer bekannten oder in dieser Arbeit detektierten Interaktionspartner keinerlei Interaktionssignale.

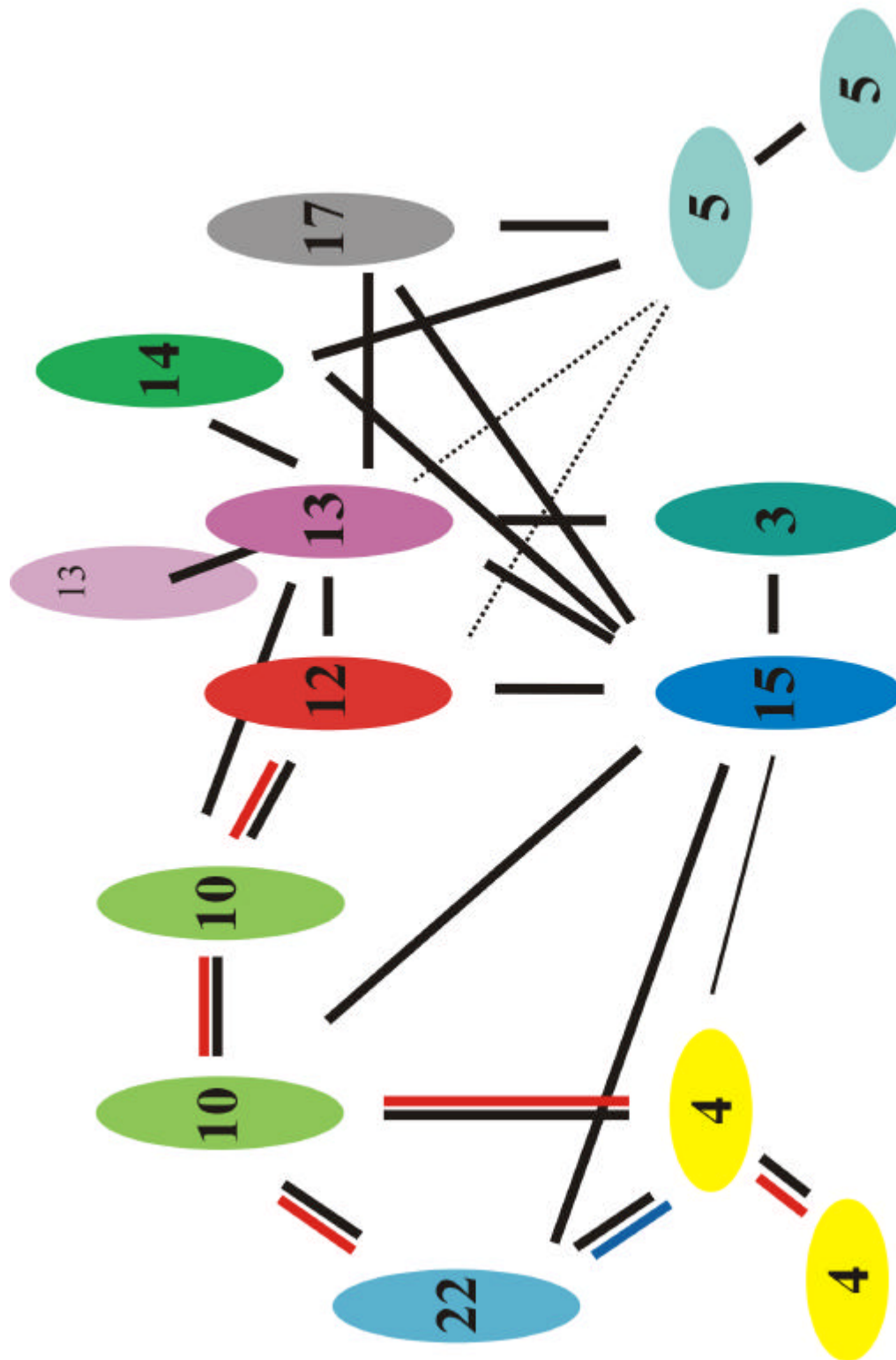


Abb. 4.1: Mittels Split-Ub erstelltes Interaktionsnetzwerk der peroxisomalen Membranproteine. Dargestellt sind die Interaktionen der vermutlich am peroxisomalen Proteinimport beteiligten Proteine. Deutliche Signale im Split-Ub sind als dicke schwarze Balken dargestellt, schwächere Interaktionen und solche, die nur in einem Wachstumsstadium (FOA oder Ura) beobachtet wurden, sind als dünne schwarze Linien gekennzeichnet. Interaktionen, die sehr schwach waren oder nur durch Verwendung von Deletionsstämmen zu beobachten waren, sind durch gestrichelte schwarze Linien beschrieben. Würden Interaktionen durch Koimmunopräzipitationen oder chemische Kreuzvernetzung bestätigt, so sind diese als rote Linie, bei Bestätigung durch Deletionsanalyse durch eine blaue Linie gekennzeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Interaktion zwischen Pex4p und Pex5p nicht dargestellt; ebenso alle Interaktionen mit Pex11p, Pex19p und den Proteinen des ER.

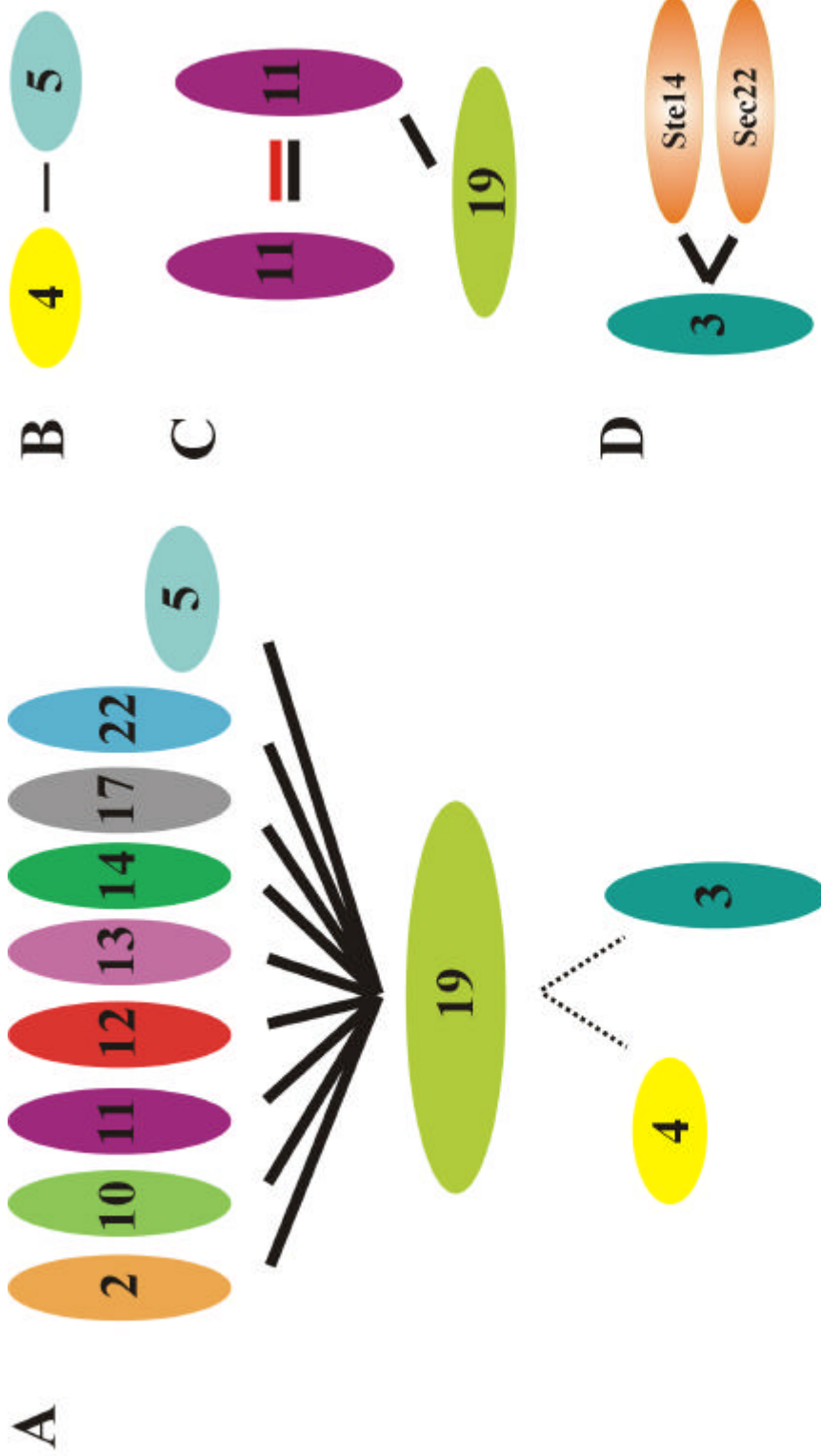


Abb. 4.2: Mittels Split-Ub erstelltes Interaktionsnetzwerk der peroxisomalen Membranproteine (2. Teil). Dargestellt sind die nicht in Abb. 4.1 erfassten Interaktionen peroxisomaler Membranproteine. Deutliche Signale im Split-Ub sind als dicke schwarze Balken dargestellt, schwächere Interaktionen und solche, die nur in einem Wachstumstest (FOA oder Ura) beobachtet wurden, sind als dünne schwarze Linien dargestellt. (A) Interaktionspartner von Pex19p, starke Interaktionen sind oberhalb, schwache unterhalb von Pex19p angegeben. (B) Pex4p interagiert mit Pex3p. (C) Interaktionen von Pex11p: Interaktionen wurden mittels des Split-Ub-Wachstumstests (schwarz) oder des -RGFP-Tests detektiert. (D) Interaktionen von Pex3p mit mitochondrialen Markerproteinen: die Interaktionen von Pex3p mit peroxisomalen Membranproteinen sind in Abb. 4.1 dargestellt. Starke Interaktionen sind als dicke schwarze Linie angegeben.

Da Pex22-NuI zumindest teilweise funktionell ist, kann man davon ausgehen, dass sich dieses Fusionsprotein nicht im gleichen Maße zur Interaktionsanalyse eignet wie die eingesetzten N-terminalen Nub-Fusionsproteine. Denkbare Ursachen wären eine schlechtere Zugänglichkeit der Nub-Domäne für Cub oder die Ubps aufgrund der N-terminalen Fusion, eine reduzierte Fähigkeit der Nub-Domäne, seinen korrekten Faltungszustand einzunehmen, oder eine verringerte Interaktionsfähigkeit des Nub in Folge sterischer Hinderung durch das Testprotein. Das wenngleich schwache Interaktionssignal zwischen Pex22-Cub-RUra3p und Pex22-NuI bekommt somit eine zusätzliche Bedeutung und weist auf eine Multimerisierung des Pex22p in der Membran des Peroxisoms hin. Durch Einsatz einer längeren Linkerpeptid-Sequenz zwischen dem Testprotein und Nub könnte die Ursache für die verringerte Interaktionsfähigkeit näher eingegrenzt werden und im Falle sterischer Hinderung vermutlich auch zu beheben sein.

Zur Zeit sind 23 Peroxine bekannt (Holroyd und Erdmann, 2001; Titorenko und Rachubinski, 2001). Insgesamt wurden in dieser Arbeit 13 Nub-Peroxin- und 11 Peroxin-Cub-RUra3p-Fusionsproteine analysiert. Die Peroxine Pex6p, Pex7p, Pex8p, Pex9p, Pex16p, Pex18p, Pex20p, Pex21p und Pex23p wurden aus verschiedenen Gründen nicht getestet. Einige dieser Proteine scheinen in *S. cerevisiae* nicht zu existieren und sind bisher nur in anderen Organismen identifiziert worden (Pex9p, Pex16p, Pex20p, Pex23p; Subramani *et al.*, 2000). Da gezeigt worden war, dass Pex1p und Pex6p heterodimerisieren, wurde davon ausgegangen, dass der Interaktionstest für Pex1p auch Aufschluss über die Bindungspartner von Pex6p liefern würde (Faber *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 1998; Kiel *et al.*, 1999). Pex8p wurde auf der Matrixseite der peroxisomalen Membran lokalisiert (Rehling *et al.*, 2000) und eignet sich daher nicht für die Analyse mittels des Split-Ubiquitin-Systems. Da im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit die Interaktionen der peroxisomalen Membranproteine miteinander standen, wurde auf die Analyse der löslichen und überwiegend cytosolisch lokalisierten Peroxine Pex7p, Pex18p und Pex21p des PTS2-Rezeptorkomplexes verzichtet, zumal mit Pex5p (PTS1-Rezeptor) ein PTS-Rezeptor modellhaft in die Interaktionsmatrix einbezogen war (van der Leij *et al.*, 1993; Marzioch *et al.*, 1994; Purdue *et al.*, 1998; Matsumura *et al.*, 2000; Holroyd und Erdmann, 2001).

4.3 Erkenntnisse über den putativen Translokationskomplex des Peroxisoms

4.3.1 Der Rezeptorbindungskomplex

Pex5p und Pex7p sind die Signalsequenz-Erkennungsproteine für PTS1 bzw. PTS2. Sie binden an peroxisomale Importsubstrate, die die jeweiligen PTS besitzen, und führen diese an die Membran des Peroxisoms, indem sie an einen dort lokalisierten Rezeptorkomplex binden (van der Leij *et al.*, 1993; Albertini *et al.*, 1997; Girzalsky *et al.*, 1999). Dieser Rezeptorkomplex wird aus den Transmembranproteinen Pex13p und Pex17p und dem putativen Transmembranprotein Pex14p gebildet. Einige der bekannten Interaktionen dieser Proteine miteinander und mit Pex5p konnten in dieser Arbeit auch *in vivo* durch die Split-Ub-Methode bestätigt werden. Eindeutig konnten die Interaktionen von Pex13-Cub-RUra3p mit NuI-Pex13 und NuI-Pex14, von Pex17-Cub-RUra mit NuI-Pex13 und von Pex14-Cub-RUra3p mit NuI-Pex13 beobachtet werden. Die in dieser Arbeit beschriebene Multimerisation von Pex13p ist bisher mit anderen Methoden nicht detektiert worden. Da der Split-Ub-Test nicht nur direkte Protein-Protein-Interaktionen misst, konnte nicht unterschieden werden, ob es sich dabei um eine Di- oder Multimerisierung des Pex13p oder um eine Di- oder Multimerisierung des gesamten Rezeptorkomplexes handelt. Hierüber könnten am besten Bindungsexperimente *in vitro* Aufschluss geben, da auch die Koimmunopräzipitationen nicht zwischen beiden Möglichkeiten unterscheiden können. Die mittels Two-Hybrid-Methode und mittels Koimmunopräzipitation belegte Bindung zwischen Pex17p und Pex14p (Huhse *et al.*, 1998) konnte mit der Split-Ub-Methode nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass im nicht-funktionellen Fusionsprotein NuI-Pex14 die Fähigkeit zur Bindung an Pex13p erhalten, die zur Bindung an Pex17p aber verloren gegangen ist. Es ist denkbar, dass Pex14p mit seinem N-Terminus an Pex17p bindet und die Bindung durch die N-terminale Modifikation gestört wird.

Ähnliche Argumente treffen auch auf die Interaktion zwischen dem Signalsequenz-Rezeptorprotein Pex5p und den verschiedenen Rezeptorkomponenten zu. NuI-Pex5 zeigt ein eindeutiges Interaktionssignal mit Pex14- und Pex17-Cub-RUra3p, nicht jedoch mit Pex13-Cub-RUra3p. Umgekehrt zeigt Pex5-Cub-RUra3p nur mit NuI-Pex5 und schwächer mit NuI-Pex19 Interaktionssignale, mit NuI-Pex13 und NuI-Pex14 jedoch keine. Offensichtlich sind also die wechselseitigen Interaktionen zwischen Pex5p, Pex13p und Pex14p nicht in jeder Kombination von Nub- und Cub-Fusionsproteinen dieser Testproteine darstellbar. Bedenkt man, dass viele der Fusionsproteine nicht oder nur teilweise funktionell sind, so ist dies nicht verwunderlich. So sind zum Beispiel Pex13-Cub-RUra3p, NuI-Pex5 und NuI-Pex14 nicht

funktionell. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Pex14p und Pex5p zwar beide an die C-terminale SH3-Domäne von Pex13p binden, jedoch an unterschiedliche Sequenzabschnitte (Bottger *et al.*, 2000). So könnte also entweder die N-terminale Fusion von Nub an Pex14p die Interaktion stören, oder aber die C-terminale Fusion an Pex13p, ohne dass dies bedeuten müsste, dass NuI-Pex5 keinesfalls mehr an das C-terminal modifizierte Pex13p binden kann.

Die gemessene Interaktion von Pex5-Cub-RUra3p mit NuI-Pex5 befindet sich in Übereinstimmung mit biochemischen Untersuchungen an Pex5p aus Säugern, die bestätigen, dass Pex5p multimerisiert und vermutlich als Tetramer vorliegt (Schliebs *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen Pex5-Cub-RUra3p und NuI-Pex19 hingegen wurde bislang noch nicht beschrieben und überrascht, da Pex5p keine Transmembranelemente besitzt und die Aufgabe von Pex19p bislang ausschließlich im Bereich des Imports von PMP vermutet wird (Gloeckner *et al.*, 2000; Sacksteder *et al.*, 2000). Weitere Experimente müssten die hier gemessene Nähe verifizieren und die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion überprüfen.

4.3.2 Der putative Translokationskomplex

Verschiedene Studien, vor allem in Säugerzelllinien, die Deletionen in verschiedenen *PEX*-Genen aufweisen, machen wahrscheinlich, dass Pex2p, Pex4p, Pex10p, Pex12p und Pex22p, das in der peroxisomalen Matrix befindliche Pex8p sowie die beiden zur AAA-Familie gehörigen Proteine Pex1p und Pex6p an einem Schritt im Proteinimport beteiligt sind, der auf die Bindung der PTS-Rezeptoren an die Membran folgt (Dodt und Gould, 1996; Chang *et al.*, 1999a, b, Collins *et al.*, 2000; Okumoto *et al.*, 2000, Albertini *et al.*, 2001, Reguenga *et al.*, 2001). Interaktionen von Pex4p und Pex22p (Koller *et al.*, 1999a), von Pex10p und Pex12p (Chang *et al.*, 1999b; Okumoto *et al.*, 2000) sowie von Pex1p mit Pex6p (Faber *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 1998; Kiel *et al.*, 1999) waren in verschiedenen Organismen beschrieben worden. Detaillierte Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Komplexes lagen jedoch nicht vor. In dieser Arbeit konnte das Bild hier entscheidend weiterentwickelt werden. Die bekannte Interaktion zwischen Pex10p und Pex12p konnte durch Split-Ubiquitin wie durch Koimmunopräzipitation bestätigt werden. Darüber hinaus wurde zum ersten Mal die Interaktion von Pex10p mit Pex10p *in vivo* mittels Split-Ub-Methode gemessen und durch die Koimmunopräzipitation der ha- und myc-gekoppelten Proteine bestätigt. Ebenso wurde die Nähe von Pex4p und Pex22p zu Pex10p ermittelt. Beide Proteine konnten als Pex4-9Myc bzw. Pex22-9Myc das Fusionsprotein Pex10-6ha in geringen Mengen, aber doch in klarer Abgrenzung zur Negativkontrolle Pex11-9Myc, präzipitieren; umgekehrt gelang jedoch die

Immunopräzipitation von Pex4-9Myc und Pex22-9Myc mit Pex10-6ha nicht. Ob es sich bei der zwischen Pex10p und Pex4p mittels der Split-Ub-Methode gemessenen Nähe um eine direkte Proteininteraktion handelt, muss daher noch sehr zurückhaltend beurteilt werden. Möglicherweise reflektiert das Ergebnis der Koimmunopräzipitation (Ko-IP) den temporären oder sehr labilen Charakter der Interaktion. Zu diesem Zeitpunkt kann die Existenz eines zusätzlichen Proteins, das die Nähe zwischen Pex22p-Pex4p und Pex10p vermittelt, nicht ausgeschlossen werden, was so die Interpretation der Ko-IP-Experimente zusätzlich erschwert. Mit seinen multiplen Interaktionen nimmt Pex10p eine ähnlich zentrale Rolle im putativen Translokationskomplex ein wie Pex13 im Rezeptor-Bindungskomplex. Obwohl ein reines Interaktionsnetzwerk nie den Beweis erbringen kann, verdichtet sich doch der Verdacht, dass Pex10p am eigentlichen Transportvorgang eines peroxisomalen Matrixproteins über die Membran hinweg beteiligt ist.

4.3.2.1 Orientierung und molekulare Anatomie von Pex12p

Keine Aussage kann in dieser Arbeit über die Orientierung von Pex12p gemacht werden. Unstrittig ist in der Literatur, dass der C-Terminus cytosolisch lokalisiert ist (Kalish *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Okumoto und Fujiki, 1997; Okumoto *et al.*, 1998), doch wurde kürzlich der N-Terminus von Pex12p in *Saccharomyces cerevisiae* auf der Matrixseite lokalisiert (Albertini *et al.*, 2001). Das N-terminale Fusionsprotein von Pex12p, NuI-Pex12, war zumindest teilweise funktionell und detektierte dennoch keine einzige der Interaktionen, die mit Hilfe des Pex12-Cub-RUra3p gemessen wurden. Dieser Befund spricht für die Lokalisation des N-Terminus von Pex12p im Innenraum des Peroxisoms.

Die Unterteilung von Pex12p in ein Konstrukt, das ausschließlich aus dem C-terminalen Teil des Proteins, nämlich die dem Ring-Finger-Motiv ähnliche Domäne (kurz: Ring-Finger) und dem Cub-RUra3p-Modul bestand, und einem zweiten Konstrukt, das nur die übrigen Regionen von Pex12p (Pex12 Δ Ring) und das Cub-Reporter-Modul umfasste, half die für die Interaktionen mit anderen PMP benötigten Regionen einzugrenzen. Ohne den Ring-Finger verliert das Pex12-Fusionsprotein die Fähigkeit mit NuI-Pex10 und NuI-Pex13 zu interagieren. Dies bestätigte die Beobachtungen von Okumoto *et al.* (2000) und Albertini *et al.*, (2001), doch konnte mit dem Fusionsprotein des Ring-Fingers alleine die Interaktion mit NuI-Pex10 und -Pex13 nicht positiv identifiziert werden. Pex12Ring-Cub-RUra3p interagierte nur mit dem cytosolischen Markerprotein NuI-Guk1p und wird somit vermutlich nicht an die peroxisomale Membran lokalisiert wird. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Pex12 Δ Ring

nur noch mit NuI-Pex19p interagiert. Zusammen mit der von Okumoto *et al.* (2000) beschriebenen Entbehrlichkeit dieser Domäne für die korrekte Lokalisation von Pex12p ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass Pex19p tatsächlich eine Rolle in der Zielssteuerung der PMP besitzt (Hettema *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001).

4.3.3 Interaktion zwischen Rezeptorbindung- und Translokationskomplex

Der Rezeptorbindungskomplex und der Translokationskomplex der peroxisomalen Membran sind keine unabhängig voneinander wirkenden Einheiten. Um den effektiven Transport der Importsubstrate zu gewährleisten muss eine enge Verbindung zwischen den Komplexen gefordert werden. Tatsächlich konnten durch den Nachweis von Interaktionen zwischen Pex12p und Pex13p sowie zwischen Pex10p und Pex13p die Partner dieser Verbindung identifiziert werden. Kürzlich wurde eines dieser Interaktionspaare auch durch Koimmunopräzipitation von Pex13p mit Pex12p und weiteren Komponenten beider Komplexe bestätigt (Albertini *et al.*, 2001). Auch die unter 4.3.2.1 beschriebene Abhängigkeit des Split-Ub-Interaktionssignals zwischen Pex12p und Pex13p von der Ringdomäne von Pex12p macht eine direkte Interaktion wahrscheinlich.

4.3.4 Der Pex4p-Pex22p-Pex10p-Pex12p-Subkomplex - Spielt Ubiquitin eine Rolle?

Das Split-Ubiquitin-Verfahren konnte neben der räumlichen Nähe zwischen Pex22p und Pex4p weiterhin eine enge Nachbarschaft zwischen Pex22p und Pex10p, Pex15p sowie Pex19p demonstrieren. Weiteren Aufschluss über die Hierarchie von Interaktionen in einem Netzwerk von Proteininteraktionen kann erhalten werden, wenn Komponenten des Netzwerks deletiert werden und die Auswirkungen dieser Deletion auf andere Interaktionen gemessen werden. Dieses Vorgehen wurde zunächst beispielhaft in einem *pex22*-Deletionsstamm durchgespielt. Dieser Stamm ermöglichte den Beweis, dass für die Nähe von NuI-Pex4 zu Pex10-Cub-RUra3p die Anwesenheit von Pex22p erforderlich war. Kontrollexperimente belegten, dass dieser Effekt nicht auf einer erhöhten Abbaurrate von Pex4p in $\Delta pex22$ -Zellen beruhte. Somit konnte geschlossen werden, dass Pex22p für die Rekrutierung von Pex4p an den Translokationskomplex der peroxisomalen Membran erforderlich war. Für Pex4-Cub-RUra3p war auch eine starke Wechselwirkung mit NuI-Pex4p beobachtet worden. Pex4-9Myc und Pex4-6ha ließen sich zwar nicht gemeinsam immunopräzipitieren, konnten aber nach chemischer Kreuzvernetzung gemeinsam isoliert werden (der maximal mit dem Vernetzungsagens DSP überbrückbare Abstand betrug 12 Å (1,2 nm)). Eine Two-Hybrid-

Analyse ergab, dass die Pex4p-Pex4p-Interaktion offenbar nicht im Zellkern rekonstituiert werden kann. Trotz der negativen Two-Hybrid-Analyse ist weiterhin denkbar, dass Pex4p, wie für einige andere Ubiquitin-konjugierende Proteine beschrieben, dimerisiert (z.B. Pickart und Rose, 1985).

Zugleich zeigt die Analyse der Interaktionen von Pex4p aber auch ein Problem auf, das generell bei der Interpretation der Daten aus dem Split-Ub-Verfahren entsteht. Wie eingangs geschildert, misst die Split-Ub-Methode die lokale Konzentration von Nub- und Cub-Fusionsproteinen. Dabei ist die Methode nicht in der Lage, zwischen einer Interaktion der Ub-Hälften aufgrund räumlicher Nähe oder aufgrund direkter Interaktion der fusionierten Proteine zu unterscheiden. Diese Einschränkung teilen auch andere Verfahren wie die chemische Kreuzvernetzung (gezeigt z. B. bei Müsch *et al.*, 1992). Durch weitergehende Analysen wie etwa die Verwendung von Deletionsstämmen im Split-Ub-System, Koimmunopräzipitationsexperimente oder Two-Hybrid-Analysen können zumindest weitere Hinweise darauf erhalten, welcher Natur die durch die Reassoziierung von Nub und Cub gemessene Interaktion ist.

In dieser Arbeit konnte erstmals beschrieben werden, dass das Ubiquitin-konjugierende Protein Pex4p (E2) über Pex22p als Rekrutierungsfaktor in enger Nachbarschaft zu Pex10p und damit indirekt auch zu Pex12p zu liegen kommt. Pex10p und Pex12p besitzen Regionen, die den Ring-Finger-Domänen ähnlich sind. Ring-Finger-Domänen sind charakteristische Elemente von E3-Proteinen, den sogenannten Recogninen oder Substraterkennungsproteinen im Ubiquitylierungsprozess (Xie und Varshavsky, 1999; Joazeiro und Weissman, 2000; vgl. Abb. 4.3A). Diese Ringdomänen binden entweder direkt an die Ub-konjugierenden Proteine (Ubc) oder aber sind für die Ubiquitylierung des Substrates wichtig, ohne selbst als Bindungsstellen für die Ubc zu dienen (Joazeiro und Weissman, 2000). Die hier gezeigten Daten lassen sich so interpretieren, dass Pex4p an Pex22p bindet und die Nachbarschaft zwischen Ringdomäne(n) und Ubc über die Bindung von Pex10p an den gemeinsamen Bindungspartner Pex22p hergestellt wird. Für dieses Modell fehlt allerdings der Nachweis, dass es sich bei Pex10p und / oder Pex12p um Proteine mit E3-Eigenschaften handelt. Zwar ist die Ringdomäne wichtig für die Funktion beider Proteine (Okumoto *et al.*, 2000; diese Arbeit), doch konnte nicht gezeigt werden, dass diese Domänen, wie für andere Ring-Finger beschrieben, ubiquityliert werden.

Da bereits Wiebel und Kunau (1992) und Crane *et al.*, (1994) gezeigt hatten, dass Pex4p mit Ubiquitin über einen Thioester reversibel konjugiert werden kann, stellt sich weiterhin die Frage nach den natürlichen Substraten des Ub-konjugierenden Enzyms Pex4p. Interessanterweise fanden van der Klei *et al.* (1998) heraus, dass der $\Delta pex4$ -Phänotyp durch Überexpression von Pex5p suprimiert werden kann und dass der cytosolisch lokalisierte Anteil an Pex5p in $\Delta pex4$ -Stämmen erheblich reduziert ist. Auch unterbindet die Deletion von *PEX4* lediglich den PTS1-abhängigen (Pex5p-abhängigen) Import peroxisomaler Matrixproteine. Die Beobachtung deutet an, dass Pex4p an der Rückgewinnung von Pex5p für den Importprozess beteiligt ist. Ein Modell einer entsprechenden Ubiquitylierungskaskade findet sich in Abb. 4.3B. Als hypothetisches Substrat wird darin Pex5p angenommen. Die ebenfalls in der Abbildung angedeutete Interaktion zwischen Pex5p und Pex12p ist von Chang *et al.* (1999) mit den homologen Säugerproteinen demonstriert worden.

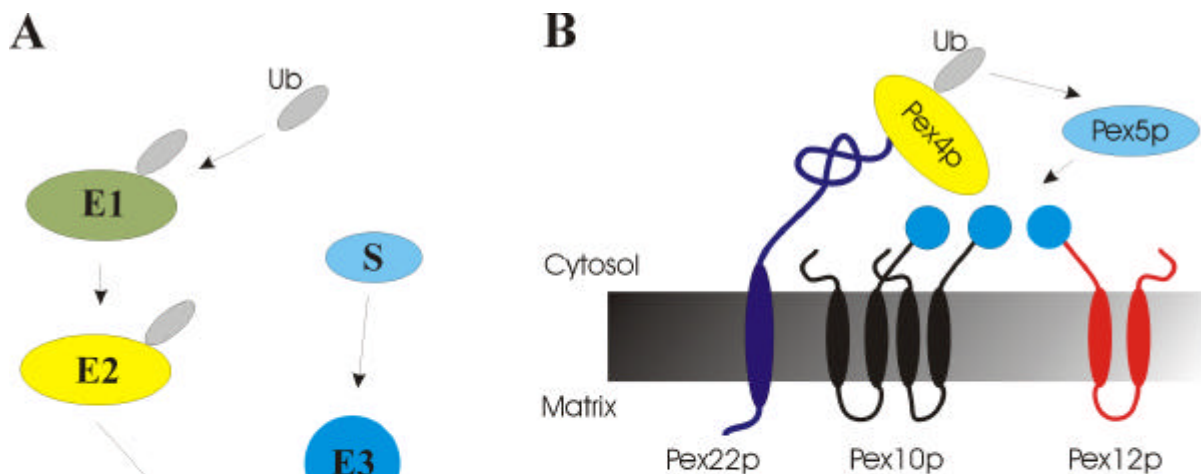


Abb. 4.3: Hypothetisches Modell möglicher Ubiquitinierungsprozesse am Translokon des Peroxisoms. (A) Übersicht über die in Hefe an der Ubiquitinierung beteiligten Proteine. Das 76 Aminosäuren große Protein Ubiquitin (Ub) wird unter ATP-Verbrauch an das Ub-aktivierende Protein E1 gekoppelt und von dort an das Ub-konjugierende E2 weitergegeben. Das Substrat (S) wird vom Substrat-Erkennungsprotein E3 (Recognin) gebunden. E2 bindet an die Ring-Finger-Domäne von E3 und ligiert Ub an das Substrat. (B) Modell eines Ubiquitinierungskomplexes, wie er nach den Daten dieser Arbeit möglich erscheint. Das E2 Pex4p wird durch Pex22p an die Zink-Ring-Domänen der putativen E3 Pex10p und/oder Pex12p rekrutiert. Dort wird das an ebendiese Domäne bindende putative Substrat Pex5p mit Ubiquitin ligiert.

Zukünftige Arbeiten werden offensichtlich zunächst darauf fokussiert sein, das Substrat der vermuteten Ubiquitylierungsreaktion zu identifizieren. Hierbei könnte die Expression von mit einem Epitop (z.B. myc) markiertem Ub in der Zelle helfen. Das vermutete Substrat, zunächst offenbar Pex5p, würde mit einem anti-Pex5p-Antikörper präzipitiert und anschließend das Ub mittels eines gegen das Epitop (myc) gerichteten Antikörpers immunochemisch nachgewiesen. Ist das ubiquitylierte Substrat bekannt, so ließe sich anschließend durch

Mutationsanalyse in den Ringdomänen von Pex10p bzw. Pex12p untersuchen, ob diese Proteine tatsächlich die E3-Funktion erfüllen (Xie und Varshavsky, 1999). Schließlich sollten auch die einzelnen Deletionsmutanten aller Ub-spezifischen Proteasen (Ubps) auf ihr Wachstumsverhalten auf Ölsäure getestet werden. Damit könnte möglicherweise eine Ubiquitin-spezifische Protease identifiziert werden, die am peroxisomalen Translokationsprozess beteiligt ist (zur Methode vgl. Erdmann *et al.*, 1989).

4.3.5 Pex2p

Neben Pex10p und Pex12p besitzt auch Pex2p eine dem Ring-Finger-Motiv ähnliche Domäne. Aufgrund von Beobachtungen an verschiedenen Deletionsmutanten (Dodt und Gould, 1996; Gould und Valle, 2000), einer Interaktion zwischen Pex10p und Pex2p *in vitro* (Okumoto *et al.*, 2000) und der kürzlich gezeigten Koimmunopräzipitation von Pex2p, Pex12p, Pex14p und Pex5p (Reguenga *et al.*, 2001) wird postuliert, dass alle drei Ring-Finger-ähnlichen Proteine Pex2p, Pex10p und Pex12p gemeinsam im Translokationskomplex des Peroxisoms fungieren. Im Split-Ub-Test verhält sich Pex2-Cub-RUra3p jedoch ganz anders als Pex10- und Pex12-Cub-RUra3p, indem es nur mit NuI-Pex19, nicht aber mit anderen integralen Membranproteinen des Peroxisoms interagiert. Da Pex2-Cub-RUra3p nicht vollständig funktionell ist, gleichzeitig aber nur bei maximaler Expression ausreichende Ura3p-Aktivität für den Split-Ub-Test zur Verfügung steht, sind verschiedene Interpretationen möglich. Denkbar wäre, dass die C-terminale Fusion die Erkennung der nativen Bindungspartner in der Membran des Peroxisoms vollständig verhindert oder der Ring-Finger des Pex2p in der Matrix des Peroxisoms lokalisiert ist. Die mittels des Split-Ub-Systems erstellte Interaktionskarte weist Pex2p durch den Mangel an messbaren Interaktionen eine Sonderrolle zu. Worin diese bestehen könnte, werden zukünftige Experimente zu zeigen haben.

4.3.6 Ist Pex15p eine integrale Komponente des Translokationsapparates, aber Pex19p nicht?

Pex19p ist in verschiedenen Organismen als überwiegend cytosolisch und zu einem kleinen Teil an der peroxisomalen Membran lokalisiertes Protein beschrieben worden (Götte *et al.*, 1998; Matsuzono *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1999a; Sacksteder *et al.*, 2000). Bis auf Pex4p und Pex19p weisen alle Cub-RUra3-Fusionsproteine von membrangebundenen Peroxinen eine deutliche Nähe zu NuI-Pex19 auf. Gleichzeitig führt die Deletion von Pex19p zum Verschwinden der peroxisomalen Membran (Götte *et al.*, 1998). Die peroxisomalen

Membranproteine werden zunächst im Cytosol synthetisiert (Lazarow und Fujiki, 1985) und dort von Pex19p gebunden (Sacksteder *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass Pex19p eine besondere Rolle beim Transport und/oder der Integration der PMP in die Membran spielt, indem es die neu synthetisierten PMP solubilisiert (Hetteema *et al.*, 2000; Sacksteder *et al.*, 2000). Diese Hypothese wird durch die im Split-Ub-Test gemessenen multiplen Interaktionen von NuI-Pex19p bekräftigt. Unklar ist jedoch noch, wie die PMP anschließend in die Membran gelangen. Ein Hinweis darauf, dass Pex19p tatsächlich an diesem Prozess beteiligt ist und die PMP bereits im Cytosol bindet, ist die Interaktion von NuI-Pex19 mit Pex11-Cub-RUra3p selbst in $\Delta pex3$ -Zellen, die keine peroxisomale Membran mehr besitzen (South und Gould, 1999; South *et al.*, 2000).

Ähnlich wie NuI-Pex19p zeigt auch NuI-Pex15p Interaktionen mit zahlreichen PMP-Cub-RUra3p-Fusionsproteinen. Im Unterschied zu NuI-Pex19 jedoch ist keine Interaktion mit Pex11-Cub-RUra3p und Pex2-Cub-RUra3p zu beobachten. Pex11p ist keine Komponente der Translokationsmaschinerie, jedoch ein integrales PMP (Erdmann und Blobel, 1995; Marshall *et al.*, 1995; van Roermund *et al.*, 2000). Aus den bereits diskutierten Gründen scheint Pex2-Cub-RUra3p eine Sonderrolle zu spielen. Es ergibt sich somit das Bild, dass Pex15p mit allen getesteten Komponenten des Rezeptorbindungs- und des Translokationskomplexes interagiert. Aus den Split-Ub- und Koimmunopräzipitationsanalysen des *pex15*-Deletionsstammes kann man ersehen, dass zwar im Unterschied zu den *pex3*- und *pex12*-Deletionsstämmen Pex10p stabil bleibt und viele seiner Interaktionen behält, nicht jedoch die mit Pex4p. Es könnte daher vermutet werden, dass Pex15p eine besondere Rolle für die Integrität des gesamten Importkomplexes besitzt. Über die Rolle von Pex15p ist bislang noch gar nichts bekannt. Die einzige vorhandene Studie (Elgersma *et al.*, 1997) beschreibt, dass das Protein bei Überexpression im ER angereichert wird, dass es wie Pex14p phosphoryliert wird und dass der PTS1- wie der PTS2-Importweg in *pex15*-Deletionsstämmen unterbrochen sind. Um die Hypothese zu bestätigen, dass Pex15p tatsächlich für die Integrität des Importkomplexes erforderlich ist, sollte zukünftig versucht werden, Pex15p N-terminal mit einem Epitop zu versehen und analog zu der in dieser Arbeit für Pex10p gezeigten Methode zu immunopräzipitieren und anschließend evtl. kopräzipitierte Pex-Proteine immunologisch nachzuweisen. Fluoreszenzmikroskopische Studien mit einem GFP-Pex15-Fusionsprotein könnten zudem die Frage nach der Lokalisation von Pex15p klären. Mehrere N-terminale Modifikationen von Pex15p haben sich bisher als funktionell und damit wohl auch korrekt lokalisiert gezeigt (Elgersma *et al.*, 1997; diese Arbeit).

4.3.7 Pex3p - Ein frühes Peroxin im ER und Teil des Translokons?

Pex3p wird als frühes Peroxin bezeichnet, da angenommen wird, dass es in einem sehr frühen Stadium der peroxisomalen Biogenese wirkt (Höfeld *et al.*, 1991; Baerends *et al.*, 1996; Purdue und Lazarow, 1995; Kiel *et al.*, 1995; Soukupova *et al.*, 1999). Möglicherweise spielt Pex3p auch eine Rolle am Translokationskomplex, da Snyder *et al.* (1999) Pex17p in *P. pastoris* durch chemische Kreuzvernetzung in der Nähe von Pex3p lokalisieren konnten.

Die Interaktionstests von Pex3p als NuI- und Cub-RUra3p-Fusionsprotein sind nicht eindeutig. Pex3-Cub-RUra3p zeigt nur mit NuI-Pex15 und NuI-Pex13 stärkere Interaktionssignale, etwas schwächere noch mit NuI-Pex3. Dieses Interaktionsmuster könnte auf ein Protein passen, das am Translokationskomplex lokalisiert ist, zumal diese Arbeit Pex15p ebenfalls in den Bereich des Translokationsapparates lokalisiert (4.3.7). Die Interaktion zwischen Pex13p und Pex3p wurde noch nicht beschrieben, doch ist für beide Proteine jeweils eine Interaktion mit Komponenten des Rezeptorbindungskomplexes belegt (Huhse *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1999b). Allerdings konnte die Interaktion nicht durch die umgekehrte Kombination von NuI-Pex3 mit Pex13-Cub-RUra3p bestätigt werden.

Umgekehrt zeigt NuI-Pex3 nur gegen Pex3-Cub-RUra3p und recht deutlich gegen Ste14-Cub-RUra3p Interaktionen. Neben NuI-Pex19 ist NuI-Pex3 damit das einzige Peroxin-Fusionsprotein, das im Split-Ub-Verfahren ein klares Signal gegenüber Ste14-Cub-RUra3p aufweist. Dies ließe auf eine zumindest teilweise Lokalisation im ER schließen. Obwohl Pex3p nach übereinstimmenden Studien nur eine TMD besitzt und der N-Terminus auf der Matrixseite der peroxisomalen Membran lokalisiert wird (Höfeld *et al.*, 1991; Kammerer *et al.*, 1998; Soukupova *et al.*, 1999, Ghaedi *et al.*, 2000), war NuI-Pex3 funktionell und detektierte Interaktionen mit Pex3-Cub-RUra3p und Ste14-Cub-RUra3p, nicht jedoch mit Pex13-Cub-RUra3p, wie von der Interaktion von Pex3-Cub-RUra3p mit NuI-Pex13 zu erwarten gewesen wäre. In früheren Arbeiten ist die Beteiligung des ER an der Biogenese des Peroxisoms häufig diskutiert worden; vor allem, aber nicht ausschließlich basierend auf Arbeiten in *Y. lipolytica* (Elgersma *et al.*, 1997; Titorenko *et al.*, 1997; Titorenko und Rachubinski, 1998a, b; Snyder *et al.*, 1999a; South und Gould, 1999; Ghaedi *et al.*, 2000; Gould und Valle, 2000; Titorenko *et al.*, 2000; Titorenko und Rachubinski, 2000). Bis heute fehlen jedoch schlüssige Belege für eine direkte Beteiligung des ER an der Genese der peroxisomalen Membran (Ghaedi *et al.*, 2000; Gould und Valle, 2000). Dass das stabil exprimierte und in seiner Spezifität für Interaktionen ausgiebig untersuchte Ste14-Cub-RUra3p (Lewke, 2000) stark mit NuI-Pex3 und NuI-Pex19 interagiert, legt jedoch den

Verdacht nahe, dass diese beiden funktionellen Nui-Peroxin-Fusionsproteine tatsächlich zumindest teilweise an der Membran des ER lokalisiert sind und dort auch eine Funktion ausüben. Ob es sich hierbei um die Integration von weiteren PMP und die Abknospung und Bildung früher peroxisomaler Vesikel handelt, bleibt zur Zeit noch völlig offen und konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.3.7.1 Genomweite Suche nach Interaktionspartnern von Pex3p

Da Pex3-Cub-RUra3p im Split-Ub-Test nur mit zwei NuI-Fusionsproteinen zu interagieren scheint und Pex3p als frühes Peroxin offenbar eine entscheidende Rolle bei der Biogenese des Organells spielt, wurde Pex3-Cub-RUra3p als Zielprotein für eine genetische Suche nach Interaktionspartnern eingesetzt. Nub-Fusionsgenbanken wurden hierzu mit dem Zielprotein Pex3-Cub-RUra3p koexprimiert. Die Versuche mit einer von N. Lehming zur Verfügung gestellten NuI-Fusionsgenbank führten nicht zur Identifizierung von Kandidaten, obwohl mit dieser Methode und gleicher Genbank bereits erfolgreich nach Transkriptionsfaktoren in *S. cerevisiae* gesucht worden war (Gromöller und Lehming, 2000a, b; Laser *et al.*, 2000). Ursache hierfür war vermutlich die zu geringe Größe der Genomfragmente. Die Verwendung der von C. Reichel (GPC) zur Verfügung gestellten NuI-Fusionsgenbank mit größeren Inserts führte zwar zur Isolierung zahlreicher potentieller Kandidaten, von denen jedoch keiner einem anerkannten ORF des Hefegenoms entsprach. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Wahl des Zielproteins Pex3p liegen, da die Rolle des Proteins und seine Lokalisation nicht ganz eindeutig zu bestimmen ist.

Die wahren Ursachen für das Scheitern dieses Ansatzes können erst dann weiter eingegrenzt werden, wenn weitere Erfahrungen mit dem Split-Ub-Screen an peroxisomalen Proteinen gewonnen sein werden.

4.4 Protein-Protein-Interaktionen außerhalb des Translokationskomplexes

4.4.1 Pex11p

Pex11p wird zwar als Peroxin bezeichnet, doch zeigte sich in den letzten Jahren, dass es an der eigentlichen Biogenese oder dem Import der peroxisomalen Matrixproteine nicht beteiligt ist. Vielmehr wird heute angenommen, dass Pex11p entweder direkt oder auf indirektem Wege den Transport von mittellangen Fettsäuren in das Peroxisom fördert (van Roermund *et al.*, 2000). Zusätzlich stimuliert Pex11p die Proliferation und Teilung des Peroxisoms. Die

Deletion von *PEX11* führt zur Ausbildung weniger vergrößerter Peroxisomen, die Überexpression von Pex11p resultiert in einer vermehrten Anzahl kleiner Peroxisomen (Erdmann und Blobel, 1995; Marshall *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 1998).

Das in dieser Arbeit erstellte Interaktionsprofil von Pex11p reflektiert diese Sonderrolle. Kein NuI-Peroxin-Fusionsprotein außer NuI-Pex19 und NuI-Pex11 interagiert mit Pex11-Cub-RUra3p; umgekehrt interagiert NuI-Pex11 nicht mit den Cub-RUra3p-Fusionsproteinen anderer Peroxine. Die Interaktion zwischen Pex19p und Pex11p findet, wie unter 4.3.6 eingehend diskutiert, wahrscheinlich während des Einbaus von Pex11p in die peroxisomale Membran statt. Sie ist in *H. sapiens* bereits beschrieben worden (Sacksteder *et al.*, 2000). Weiterhin zeigt das Split-Ub-basierte Interaktionsprofil an, dass Pex11p dimerisiert oder noch größere Mulimere bildet. Marshall *et al.* (1996) hatten eine Dimerisierung in *T. brucei* beschrieben, die hier nun auch in *S. cerevisiae* bestätigt werden konnte.

Durch den Nachweis unveränderter Pex11p-Pex11p-Interaktionen in Zellen, die keine peroxisomalen Membranen mehr aufweisen, konnte gezeigt werden, dass die Einbettung in die peroxisomale Membran keine Voraussetzung für die korrekte Faltung des Pex11p ist. Interessanterweise lokalisierte Pex11p in diesen Zellen ($\Delta pex3$) in die mitochondriale Membran. Dabei blieb die Interaktion mit Pex19p als putativem Solubilisierungs- und Zielsteuerungsfaktor (vgl. 4.3.6) erhalten. Ob Pex19p für den Einbau des Pex11p in die Membran des Mitochondriums benötigt wird, ist eine interessante Frage, die über den Pex11-Cub-RUra3p-Interaktionstest in einer *pex3-pex19*-Doppelmutante geklärt werden könnte. Diese Mutante ist im Rahmen dieser Arbeit bereits dargestellt worden, so dass diese Untersuchung in naher Zukunft durchgeführt werden kann. Mit Hilfe des R-GFP-Reporters gelang es nachzuweisen, dass die Dimerisation von Pex11p in WT-Zellen sehr wahrscheinlich ausschließlich auf der Oberfläche des Peroxisoms stattfindet. Dennoch ist die Fehllokalisierung peroxisomaler Membranproteine zur mitochondrialen Membran sowohl in Deletionsstämmen wie auch als (zumeist unfunktionelle) Fusionsproteine von PMP mehrmals in dieser Arbeit beobachtet worden. Diese Misslokalisierung ist auch in der Literatur bereits beschrieben (Okumoto *et al.*, 1998; South *et al.*, 2000). Peroxisomen und Mitochondrien sind funktionell gekoppelt, vor allem im Bereich der β -Oxidation der Fettsäuren, wenngleich es hinsichtlich der Substratspezifität und des Mechanismus der Reaktion distinkte Unterschiede gibt und auch funktionell identische Enzyme für beide Kompartimente von unterschiedlichen Genen

kodiert werden. Reddy und Mannaerts (1994), Kunau *et al.* (1995), Hiltunen *et al.* (1996) und Hashimoto (1999) haben sich umfassend mit den funktionellen Kopplungen beider Organellen sowie den spezifischen Unterschieden der Stoffwechselwege beschäftigt.

4.5 Lokalisationsstudien

In dieser Arbeit konnten verschiedene Formen der Lokalisation von Proteinen und der Darstellung ihrer Wechselwirkungen beschrieben werden. Zunächst kann die differentielle Lokalisation von verschiedenen Translationsprodukten ein und des selben Gens mittels der Split-Ub-Methode untersucht werden, wie hier am Beispiel von Pex2-Cub-RUra3p und Pex2 Δ N- Cub-RUra3p aufgezeigt wurde. Liu *et al.* (1996) hatten festgestellt, dass vom Gen *PEX2* in *Saccharomyces cerevisiae* zwei unterschiedlich lange mRNS-Moleküle transkribiert werden. Die Autoren vermuteten weiterhin aus den in 3.5.1 dargelegten Gründen, dass sich in der N-terminalen Sequenz eine Zielsteuerungssequenz zum Peroxisom befinden könnte. Mittels der Split-Ub-Methode konnten tatsächlich unterschiedliche Lokalisationen für Pex2p und ein N-terminal verkürztes Pex2 Δ Np nachgewiesen werden. Neben der Interaktion mit NuI-Pex19, die beide Fusionsproteine aufwiesen, zeigte Pex2 Δ N-Cub-RUra3p auch mit NuI-Tom22 ein Signal. Der Verlust der N-terminalen 46 Aminosäuren scheint demnach einen substantiellen Teil des Proteins zum Mitochondrium zu leiten. Es ist allerdings auch bei anderen Proteinen zu beobachten, dass nicht- oder nur teilweise funktionelle Fusionsproteine zur mitochondrialen Membran gelangen. Gemeinsam mit der Beobachtung, dass auch die Deletionsmutante noch mit NuI-Pex19 interagiert, lässt sich somit zwar feststellen, dass die Vorhersage von Liu *et al.* (1996) bestätigt werden konnte, aber zumindest die Bindung an das im allgemeinen als Rekrutierungsfaktor für das Peroxisom betrachtete Pex19p offenbar nicht von der N-terminalen Region abhängt.

Eine weitere hier gezeigte Anwendung des Split-Ub-Systems liegt in der Analyse uncharakterisierter offener Leseraster. In dieser Arbeit (3.6) wurde das Split-Ub Verfahren verwendet, um die Lokalisation von Ady2p zu untersuchen. Ady2 wurde als eines der Gene charakterisiert, dessen Transkription in Folge der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung induziert wird. Da unter diesen Bedingungen die Gene einiger Peroxine und anderer peroxisomaler Proteine verstärkt transkribiert werden, sollte geklärt werden, ob das Transmembranprotein Ady2 in die peroxisomale Membran lokalisiert. Das Fusionsprotein Ady2-Cub-RUra3p wurde in Zellen mit verschiedenen Nub-Markerproteinen koexprimiert und dabei keine Interaktion mit den peroxisomalen Markerproteinen beobachtet. Ady2-Cub-

RUra3p interagiert aber mit NuI-Sec22 und NuI-Snc1. Damit konnte gezeigt werden, dass Ady2p nach oder während seiner Synthese in die ER-Membran integriert wird und diese anschließend über den sekretorischen Weg via Golgi vermutlich zur Plasmamembran verlässt. Relativ sicher handelt es sich aber um kein PMP. Mit der zunehmenden Zahl von Expressionsanalysen durch Mikrochip-Arrays dürfte auch die Zahl solcher noch unbeschriebenen ORF-Kandidaten für eine bestimmte Funktions- und Lokalisationsgruppe rasch ansteigen. Die Split-Ub-Methode hat sich hier als geeignet erwiesen, den Weg eines unbekanntem ORF in der lebenden Zelle zu verfolgen und die Entscheidung, ob es sich um ein peroxisomales Membranprotein handelt, zu treffen.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte mittels der Split-Ubiquitin-Methode ein Netzwerk der Interaktionen zwischen peroxisomalen Membranproteinen erstellt werden. Ein weiterer Ausbau des Netzwerkes muss durch Einbeziehung von Transporterproteinen wie Pxa1p und Pxa2p, die Proteine des PTS2-Importweges sowie einiger Imports substrate erfolgen. Die erfolgreiche Verwendung von Deletionsmutanten zur Aufklärung von sequenziellen Abläufen von Bindungsereignissen sollte den Importprozess am Translokationskomplex des Peroxisoms aufzuklären helfen.

Durch die Herstellung einer mehr auf die Anforderungen an Membranproteine ausgerichteten NuI-Fusionsgenbank sollte es möglich sein, das Split-Ub-System ebenso erfolgreich zur Detektion von unbekanntem Interaktionspartnern von PMP einzusetzen, wie es für Transkriptionsfaktoren bereits möglich war.

Die Frage, wie die PMP in die Membran des Peroxisoms inserieren, ist noch völlig offen. Zur Beantwortung dieser und weiterer mechanistischer Fragestellungen zum Importprozess muss nun in Hefe ein Importsystem *in vitro* etabliert werden, mit dem die wichtigsten Schritte des Importes peroxisomaler Matrixproteine und der Insertion der PMP rekonstituiert werden können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mittels des Split-Ubiquitin-Systems ein Netzwerk der Interaktionen von peroxisomalen Membranproteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt. Hierdurch konnten einige bereits *bona fide* detektierte Interaktionen peroxisomaler Membranproteine bestätigt und darüber hinaus neue Interaktionen zwischen peroxisomalen Membranproteinen beschrieben werden. Einige dieser Interaktionen konnten durch alternative Techniken wie Koimmunopräzipitation und chemische Kreuzvernetzung unabhängig verifiziert werden. Damit ist zum ersten Mal gezeigt worden, dass sich die Split-Ubiquitin-Methode zur systematischen Erfassung von Proteininteraktionen auf intrazellulären Organellen anwenden lässt und die Two-Hybrid-Technik als Methode zur Erstellung des vollständigen Interaktionsnetzwerks eines Organismus sinnvoll komplementieren kann.

Das erstellte Proteinnetzwerk weist Pex10p eine zentrale Rolle im putativen Translokationskomplex des Peroxisoms zu. Pex10p di- oder multimerisiert und interagiert mit Pex12p, Pex13p, Pex22p und Pex4p. Es konnte zudem durch Analyse in Deletionsmutanten gezeigt werden, dass Pex22p Pex4p zur peroxisomalen Membran rekrutiert und für die Interaktion von Pex4p mit Pex10p erforderlich ist. Mögliche Rollen von Pex4p als Ubiquitin-konjugierendem Enzym (E2) und Pex10p / Pex12p als potentielle E3-Enzyme für eine Ubiquitylierungsreaktion am peroxisomalen Translokation werden in dieser Arbeit diskutiert.

Pex15p zeigt Interaktionen mit fast allen getesteten Peroxinen. Die Deletion von Pex15p führt zum selektiven Verlust der Interaktion zwischen Pex4p und Pex10p. Diese Daten weisen auf eine Rolle von Pex15p als ein Faktor hin, der möglicherweise die Zusammensetzung der Peroxin-Komplexe modulieren kann.

Durch den Einsatz von Hefestämmen, die keine peroxisomalen Membranen mehr aufweisen, konnte gezeigt werden, dass das Membranprotein Pex11p auch in Abwesenheit seiner nativen Umgebung falten und dimerisieren kann. Diese Reaktion findet sehr wahrscheinlich an oder in der Membran des Mitochondriums statt.

6 Zusammenfassung in englischer Sprache (Abstract)

In this study, a network of the interactions of peroxisomal membrane proteins determined by the split-ubiquitin-method in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is presented. Hereby a number of previously detected interactions between peroxisomal membrane proteins could be confirmed *in vivo* and a number of previously unknown interactions could be described. Several of the latter could be verified independently by alternative techniques such as coimmunoprecipitation and chemical cross-linking. Thereby, the applicability of the split-ubiquitin-technique for the systematic determination of interaction networks of proteins from a single intracellular organelle has been proven for the first time. It is now obvious that the split-ubiquitin-technique is a useful method to complement the Two-Hybrid-technique in the determination of the complete interaction network of proteins of an organism.

The protein network determined in this study assigns a central role in the putative translocation complex of the peroxisome to Pex10p. Pex10p di- or multimerises and interacts with Pex12p, Pex13p, Pex22p and Pex4p. Furthermore, analysis in deletion mutants proved that Pex22p recruits Pex4p to the peroxisomal membrane and is required for the interaction between Pex4p and Pex10p. Possible roles of Pex4p as a ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and of Pex10p / Pex12p as potential E3-enzymes for a ubiquitylation reaction at the peroxisomal translocon are discussed in this work.

Pex15p shows interactions with almost all peroxins tested. The deletion of Pex15p leads to the selective loss of the interaction between Pex4p and Pex10p. These data hint at a role of Pex15p as a factor which might possibly modulate the composition of the peroxin complexes.

By the application of yeast strains which lack peroxisomal membranes, it could be demonstrated that the membrane protein Pex11p can fold and dimerise even in the absence of its native environment. Most likely, this reaction takes place at or in the membrane of the mitochondrion.

7 Literaturverzeichnis

Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. A., Veenhuis, M. und Kunau, W. H. (1997). Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* 89, 83-92.

Albertini, M., Girzalsky, W., Veenhuis, M. und Kunau, W. H. (2001). Pex12p of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import. *Eur J Cell Biol* 80, 257-70.

Baerends, R. J., Rasmussen, S. W., Hilbrands, R. E., van der Heide, M., Faber, K. N., Reuvekamp, P. T., Kiel, J. A., Cregg, J. M., van der Klei, I. J. und Veenhuis, M. (1996). The *Hansenula polymorpha* PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J Biol Chem* 271, 8887-94.

Baker, R. T., Tobias, J. W. und Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3 und functional analysis of the UBP gene family. *J Biol Chem* 267, 23364-75.

Bottger, G., Barnett, P., Klein, A. T., Kragt, A., Tabak, H. F. und Distel, B. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* PTS1 receptor Pex5p interacts with the SH3 domain of the peroxisomal membrane protein Pex13p in an unconventional, non-PXXP-related manner. *Mol Biol Cell* 11, 3963-76.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Brocard, C., Lametschwandtner, G., Koudelka, R. und Hartig, A (1997). Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. *Embo J* 16, 5491-500.

Brul, S., Wiemer, E. A., Westerveld, A., Strijland, A., Wanders, R. J., Schram, A. W., Heymans, H. S., Schutgens, R. B., Van den Bosch, H. und Tager, J. M. (1988). Kinetics of the assembly of peroxisomes after fusion of complementary cell lines from patients with the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and related disorders. *Biochem Biophys Res Commun* 152, 1083-9.

Chang, C. C., Lee, W. H., Moser, H., Valle, D. und Gould, S. J. (1997). Isolation of the human PEX12 gene, mutated in group 3 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* 15, 385-8.

Chang, C. C., South, S., Warren, D., Jones, J., Moser, A. B., Moser, H. W. und Gould, S. J. (1999a). Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci* 112, 1579-90.

Chang, C. C., Warren, D. S., Sacksteder, K. A. und Gould, S. J. (1999b). PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* 147, 761-74.

- Collins, C. S., Kalish, J. E., Morrell, J. C., McCaffery, J. M. und Gould, S. J. (2000). The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p und pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *Mol Cell Biol* 20, 7516-26.
- Crane, D. I. und Gould, S. J. (1994). *The Pichia pastoris HIS4 gene: nucleotide sequence, creation of a non-reverting his4 deletion mutant und development of HIS4-based replicating and integrating plasmids.* *Curr Genet* 26, 443-50.
- Crookes, W. J. und Olsen, L. J. (1999). Peroxin puzzles and folded freight: peroxisomal protein import in review. *Naturwissenschaften* 86, 51-61.
- Dammai, V. und Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105, 187-96.
- Dansen, T. B., Wirtz, K. W., Wanders, R. J. und Pap, E. H. (2000). Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. *Nat Cell Biol* 2, 51-3.
- De Duve, C. und Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-57.
- De Duve, C., Lazarow, P. B. und Poole, B. (1974). Biogenesis and turnover of rat-liver peroxisomes. *Adv Cytopharmacol* 2, 219-23.
- De Duve, C. (1996). The peroxisome in retrospect. *Ann N Y Acad Sci* 804, 1-10.
- de Hoop, M. J. und Ab, G. (1992). Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J* 286, 657-669.
- Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H. W., Watkins, P., Valle, D. und Gould, S. J. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* 9, 115-25.
- Dodt, G. und Gould, S. J. (1996a). Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* 135, 1763-74.
- Dodt, G., Braverman, N., Valle, D. und Gould, S. J. (1996b). From expressed sequence tags to peroxisome biogenesis disorder genes. *Ann N Y Acad Sci* 804, 516-23.
- Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. und Varshavsky, A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 270, 18099-109.

Dues, G., Müller, S. und Johnsson, N. (2001). Detection of a conformational change in G- γ upon binding G- β in living cells. *FEBS Lett* 505, 75-80.

Dünnwald, M., Varshavsky, A. und Johnsson, N. (1999). Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 10, 329-44.

Eckert, J. H. (1997). Untersuchungen zu einer neuen Methode zur Messung von Proteinfaltung *in vivo*. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Eckert, J. H., Wittke, S. und Johnsson, N. (2001). Split-Ubiquitin: Ein Sensor für Interaktionen und Konformationsänderungen *in vivo*. *Biospektrum* 7, 36-39.

Eitzen, G. A., Aitchison, J. D., Szilard, R. K., Veenhuis, M., Nuttley, W. M. und Rachubinski, R. A. (1995). The *Yarrowia lipolytica* gene PAY2 encodes a 42-kDa peroxisomal integral membrane protein essential for matrix protein import and peroxisome enlargement but not for peroxisome membrane proliferation. *J Biol Chem* 270, 1429-36.

Elgersma, Y., Kwast, L., Klein, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., Metzger, B., America, T., Tabak, H. F. und Distel, B. (1996a). The SH3 domain of the *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal membrane protein Pex13p functions as a docking site for Pex5p, a mobile receptor for the import PTS1-containing proteins. *J Cell Biol* 135, 97-109.

Elgersma, Y., Vos, A., van den Berg, M., van Roermund, C. W., van der Sluijs, P., Distel, B. und Tabak, H. F. (1996b). Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal 1 in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 26375-82.

Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W. B., Distel, B., Subramani, S. und Tabak, H. F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S. cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *Embo J* 16, 7326-41.

Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W. t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R. und Butow, R. A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308.

Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D. und Kunau, W. H. (1989). Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5419-23.

Erdmann, R., Wiebel, F. F., Flessau, A., Rytka, J., Beyer, A., Fröhlich, K. U. und Kunau, W. H. (1991). PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* 64, 499-510.

Erdmann, R. und Blobel, G. (1995). Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J Cell Biol* 128, 509-23.

- Erdmann, R. und Blobel, G. (1996). Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J Cell Biol* 135, 111-21.
- Faber, K. N., Heyman, J. A. und Subramani, S. (1998). Two AAA family peroxins, PpPex1p and PpPex6p, interact with each other in an ATP-dependent manner and are associated with different subcellular membranous structures distinct from peroxisomes. *Mol Cell Biol* 18, 936-43.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Fransen, M., Brees, C., Baumgart, E., Vanhooren, J. C., Baes, M., Mannaerts, G. P. und Van Veldhoven, P. P. (1995). Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J Biol Chem* 270, 7731-6.
- Fujiki, Y. und Okumoto, K. (2000). [Peroxisome biogenesis and human disorders]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45, 691-9.
- Fujiki, Y. (2000). Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett* 476, 42-6.
- Gatto, G. J., Jr., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J. und Berg, J. M. (2000a). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol* 7, 1091-5.
- Gatto, G. J., Jr., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J. und Berg, J. M. (2000b). A proposed model for the PEX5-peroxisomal targeting signal-1 recognition complex. *Proteins* 38, 241-6.
- Geraghty, M. T., Bassett, D., Morrell, J. C., Gatto, G. J., Jr., Bai, J., Geisbrecht, B. V., Hieter, P. und Gould, S. J. (1999). Detecting patterns of protein distribution and gene expression in silico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2937-42.
- Ghaedi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Matsuzono, Y. und Fujiki, Y. (2000). The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11, 2085-102.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. und Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425.
- Girzalsky, W., Rehling, P., Stein, K., Kipper, J., Blank, L., Kunau, W. H. und Erdmann, R. (1999). Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes. *J Cell Biol* 144, 1151-62.
- Gloeckner, C. J., Mayerhofer, P. U., Landgraf, P., Muntau, A. C., Holzinger, A., Gerber, J. K., Kammerer, S., Adamski, J. und Roscher, A. A. (2000). Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 144-50.

- Götte, K., Girzalsky, W., Linkert, M., Baumgart, E., Kammerer, S., Kunau, W. H. und Erdmann, R. (1998). Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 616-28.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. und Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108, 1657-64.
- Gould, S. J. und Valle, D. (2000). Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet* 16, 340-5.
- Gould, S. J. (2001). The Peroxisome for The Scientist. In: <http://www.peroxisome.org/Scientist/Biogenesis/> (unveröffentlichte Beobachtungen).
- Gromöller, A. und Lehming, N. (2000a). Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *Embo J* 19, 6845-52.
- Gromöller, A. und Lehming, N. (2000b). Srb7p is essential for the activation of a subset of genes. *FEBS Lett* 484, 48-54.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519-24.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-16.
- Hashimoto, T., Fujita, T., Usuda, N., Cook, W., Qi, C., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Yeldandi, A. V., Rao, M. S. und Reddy, J. K. (1999). Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *J Biol Chem* 274, 19228-36.
- Heinemann, P. und Just, W. W. (1992). Peroxisomal protein import. *In vivo* evidence for a novel translocation competent compartment. *FEBS Lett* 300, 179-82.
- Henke, B., Girzalsky, W., Berteaux-Lecellier, V. und Erdmann, R. (1998). IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 273, 3702-11.
- Hettema, E. H., Ruigrok, C. C., Koerkamp, M. G., van den Berg, M., Tabak, H. F., Distel, B. und Braakman, I. (1998). The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import. *J Cell Biol* 142, 421-34.
- Hettema, E. H., Girzalsky, W., van Den Berg, M., Erdmann, R. und Distel, B. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *Embo J* 19, 223-33.

- Hiltunen, J. K., Filppula, S. A., Koivuranta, K. T., Siivari, K., Qin, Y. M. und Hayrinen, H. M. (1996). Peroxisomal beta-oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Ann N Y Acad Sci* 804, 116-28.
- Hinnen, A., Hicks, J. B. und Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1929-33.
- Höfeld, J., Veenhuis, M. und Kunau, W. H. (1991). PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *J Cell Biol* 114, 1167-78.
- Holroyd, C. und Erdmann, R. (2001). Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Lett* 501, 6-10.
- Honsho, M., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N. und Fujiki, Y. (1998). Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet* 63, 1622-30.
- Huhse, B., Rehling, P., Albertini, M., Blank, L., Meller, K. und Kunau, W. H. (1998). Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J Cell Biol* 140, 49-60.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. und Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4569-74.
- Joazeiro, C. A. und Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-52.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994a). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10340-4.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994b). Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *Embo J* 13, 2686-98.
- Jones, J. M., Morrell, J. C. und Gould, S. J. (2001). Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 153, 1141-50.
- Kalish, J. E., Keller, G. A., Morrell, J. C., Mihalik, S. J., Smith, B., Cregg, J. M. und Gould, S. J. (1996). Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins. *Embo J* 15, 3275-85.
- Kammerer, S., Holzinger, A., Welsch, U. und Roscher, A. A. (1998). Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p. *FEBS Lett* 429, 53-60.

- Kiel, J. A., Keizer-Gunnink, I. K., Krause, T., Komori, M. und Veenhuis, M. (1995). Heterologous complementation of peroxisome function in yeast: the *Saccharomyces cerevisiae* PAS3 gene restores peroxisome biogenesis in a *Hansenula polymorpha* per9 disruption mutant. *FEBS Lett* 377, 434-8.
- Kiel, J. A., Hilbrands, R. E., van der Klei, I. J., Rasmussen, S. W., Salomons, F. A., van der Heide, M., Faber, K. N., Cregg, J. M. und Veenhuis, M. (1999). *Hansenula polymorpha* Pex1p and Pex6p are peroxisome-associated AAA proteins that functionally and physically interact. *Yeast* 15, 1059-78.
- Kinoshita, N., Ghaedi, K., Shimosawa, N., Wanders, R. J., Matsuzono, Y., Imanaka, T., Okumoto, K., Suzuki, Y., Kondo, N. und Fujiki, Y. (1998). Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants are defective in biogenesis of peroxisomal membrane vesicles (Peroxisomal ghosts), representing a novel complementation group in mammals. *J Biol Chem* 273, 24122-30.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-72.
- Koller, A., Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Rangell, L., Keller, G. A. und Subramani, S. (1999a). Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* 146, 99-112.
- Koller, A., Spong, A. P., Luers, G. H. und Subramani, S. (1999b). Analysis of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene product from *Pichia pastoris* and determination of its targeting signal. *Yeast* 15, 1035-44.
- Komori, M., Kiel, J. A. und Veenhuis, M. (1999). The peroxisomal membrane protein Pex14p of *Hansenula polymorpha* is phosphorylated *in vivo*. *FEBS Lett* 457, 397-9.
- Kunau, W. H., Dommès, V. und Schulz, H. (1995). Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes und bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34, 267-342.
- Kunau, W. H. (1998). Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Curr Opin Microbiol* 1, 232-7.
- Kunau, W. H. und Erdmann, R. (1998). Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr Biol* 8, R299-302.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

- Laser, H., Bongards, C., Schuller, J., Heck, S., Johnsson, N. und Lehming, N. (2000). A new screen for protein interactions reveals that the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the GAL1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13732-7.
- Lazarow, P. B., Black, V., Shio, H., Fujiki, Y., Hajra, A. K., Datta, N. S., Bangaru, B. S. und Dancis, J. (1985). Zellweger syndrome: biochemical and morphological studies on two patients treated with clofibrate. *Pediatr Res* 19, 1356-64.
- Lazarow, P. B. und Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530.
- Lazarow, P. B. (1995). Peroxisome structure, function und biogenesis-human patients and yeast mutants show strikingly similar defects in peroxisome biogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 720-5.
- Lewke, N. (2000). Die zelluläre Verteilung der Prenylcystein Carboxylmethyltransferase Ste14p und ihres potentiellen Substrates Cdc42p in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Universität zu Köln.
- Liu, Y., Gu, K. L. und Dieckmann, C. L. (1996). Independent regulation of full-length and 5'-truncated PAS5 mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 135-43.
- Marshall, P. A., Krimkevich, Y. I., Lark, R. H., Dyer, J. M., Veenhuis, M. und Goodman, J. M. (1995). Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J Cell Biol* 129, 345-55.
- Marshall, P. A., Dyer, J. M., Quick, M. E. und Goodman, J. M. (1996). Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *J Cell Biol* 135, 123-37.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. und Kunau, W. H. (1994). PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *Embo J* 13, 4908-18.
- Matsumura, T., Otera, H. und Fujiki, Y. (2000). Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. *J Biol Chem* 275, 21715-21.
- Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimosawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R. J., Suzuki, Y., Kondo, N. und Fujiki, Y. (1999). Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome und potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2116-21.
- Mayer, R. J. (2000). The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 145-8.

- McNew, J. A. und Goodman, J. M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J Cell Biol* 127, 1245-57.
- McNew, J. A. und Goodman, J. M. (1996). The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem Sci* 21, 54-8.
- Moser, H. W., Powers, J. M. und Smith, K. D. (1995). Adrenoleukodystrophy: molecular genetics, pathology und Lorenzo's oil. *Brain Pathol* 5, 259-66.
- Musch, A., Wiedmann, M. und Rapoport, T. A. (1992). Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69, 343-52.
- Okumoto, K. und Fujiki, Y. (1997). PEX12 encodes an integral membrane protein of peroxisomes. *Nat Genet* 17, 265-6.
- Okumoto, K., Shimozawa, N., Kawai, A., Tamura, S., Tsukamoto, T., Osumi, T., Moser, H., Wanders, R. J., Suzuki, Y., Kondo, N. und Fujiki, Y. (1998). PEX12, the pathogenic gene of group III Zellweger syndrome: cDNA cloning by functional complementation on a CHO cell mutant, patient analysis und characterization of PEX12p. *Mol Cell Biol* 18, 4324-36.
- Okumoto, K., Abe, I. und Fujiki, Y. (2000). Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *J Biol Chem* 275, 25700-10.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N. und Fujiki, Y. (2000). The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p. PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *J Biol Chem* 275, 21703-14.
- Özkaynak, E., Finley, D., Solomon, M. J. und Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *Embo J* 6, 1429-39.
- Passreiter, M., Anton, M., Lay, D., Frank, R., Harter, C., Wieland, F. T., Gorgas, K. und Just, W. W. (1998). Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatomer. *J Cell Biol* 141, 373-83.
- Patel, S. und Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* 8, 65-71.
- Pickart, C. M. und Rose, I. A. (1985). Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J Biol Chem* 260, 1573-81.
- Purdue, P. E. und Lazarow, P. B. (1995). Identification of peroxisomal membrane ghosts with an epitope-tagged integral membrane protein in yeast mutants lacking peroxisomes. *Yeast* 11, 1045-60.

- Purdue, P. E., Yang, X. und Lazarow, P. B. (1998). Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* 143, 1859-69.
- Raleigh, E. A., Trimarchi, R. und Revel, H. (1989). Genetic and physical mapping of the mcrA (rglA) and mcrB (rglB) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 122, 279-96.
- Raquet, X., Eckert, J. H., Muller, S. und Johnsson, N. (2001). Detection of altered protein conformations in living cells. *J Mol Biol* 305, 927-38.
- Reddy, J. K. und Mannaerts, G. P. (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 14, 343-70.
- Reguenga, C., Oliveira, M. E., Gouveia, A. M., Sa-Miranda, C. und Azevedo, J. E. (2001). Characterization of the mammalian peroxisomal import machinery: Pex2p, Pex5p, Pex12p und Pex14p are subunits of the same protein assembly. *J Biol Chem* 276, 29935-42.
- Rehling, P., Albertini, M. und Kunau, W. H. (1996a). Protein import into peroxisomes: new developments. *Ann N Y Acad Sci* 804, 34-46.
- Rehling, P., Marzioch, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M. und Kunau, W. H. (1996b). The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PAS7 gene. *Embo J* 15, 2901-13.
- Rehling, P., Skaletz-Rorowski, A., Girzalsky, W., Voorn-Brouwer, T., Franse, M. M., Distel, B., Veenhuis, M., Kunau, W. H. und Erdmann, R. (2000). Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor pex5p. *J Biol Chem* 275, 3593-602.
- Sacksteder, K. A., Morrell, J. C., Wanders, R. J., Matalon, R. und Gould, S. J. (1999). MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J Biol Chem* 274, 24461-8.
- Sacksteder, K. A. und Gould, S. J. (2000). The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet* 34, 623-652.
- Sacksteder, K. A., Jones, J. M., South, S. T., Li, X., Liu, Y. und Gould, S. J. (2000). PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic und is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* 148, 931-44.
- Sakai, Y., Marshall, P. A., Saiganji, A., Takabe, K., Saiki, H., Kato, N. und Goodman, J. M. (1995). The *Candida boidinii* peroxisomal membrane protein Pmp30 has a role in peroxisomal proliferation und is functionally homologous to Pmp27 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177, 6773-81.

- Salomons, F. A., Kiel, J. A., Faber, K. N., Veenhuis, M. und van der Klei, I. J. (2000). Overproduction of Pex5p stimulates import of alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase in a *Hansenula polymorpha* Pex14 null mutant. *J Biol Chem* 275, 12603-11.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, M. J., Imanaka, T., Shio, H. und Lazarow, P. B. (1988a). Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem* 263, 10502-9.
- Santos, M. J., Imanaka, T., Shio, H., Small, G. M. und Lazarow, P. B. (1988b). Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome-aberrant organelle assembly. *Science* 239, 1536-8.
- Schliebs, W., Saidowsky, J., Agianian, B., Dodt, G., Herberg, F. W. und Kunau, W. H. (1999). Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. Structural basis for interaction of PEX5 with PEX14. *J Biol Chem* 274, 5666-73.
- Schrader, M., Reuber, B. E., Morrell, J. C., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Stroh, T. A., Valle, D., Schroer, T. A. und Gould, S. J. (1998). Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* 273, 29607-14.
- Schweiger, A. und Kostka, G. (1981). Properties of a 110000 molecular weight protein in rat liver hnRNP particles. *Mol Biol Rep* 7, 47-51.
- Shimizu, N., Itoh, R., Hirono, Y., Otera, H., Ghaedi, K., Tateishi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Harano, T., Mukai, S. und Fujiki, Y. (1999a). The peroxin Pex14p. cDNA cloning by functional complementation on a Chinese hamster ovary cell mutant, characterization und functional analysis. *J Biol Chem* 274, 12593-604.
- Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imamura, A., Tsukamoto, T., Osumi, T., Tateishi, K., Okumoto, K., Fujiki, Y., Orii, T., Barth, P. G., Wanders, R. J. und Kondo, N. (1998b). Peroxisome biogenesis disorders: identification of a new complementation group distinct from peroxisome-deficient CHO mutants and not complemented by human PEX 13. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 368-71.
- Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tomatsu, S., Nakamura, H., Kono, T., Takada, H., Tsukamoto, T., Fujiki, Y., Orii, T. und Kondo, N. (1998c). A novel mutation, R125X in peroxisome assembly factor-1 responsible for Zellweger syndrome. *Hum Mutat Suppl*, S134-6.
- Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imamura, A., Kondo, N., Kinoshita, N., Fujiki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., Imanaka, T., Orii, T., Beemer, F., Mooijer, P., Dekker, C. und Wanders, R. J. (1998). Genetic basis of peroxisome-assembly mutants of humans, Chinese hamster ovary cells und yeast: identification of a new complementation group of peroxisome-biogenesis disorders apparently lacking peroxisomal-membrane ghosts. *Am J Hum Genet* 63, 1898-903.

- Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Slawecki, M. L., Dodt, G., Steinberg, S., Moser, A. B., Moser, H. W. und Gould, S. J. (1995). Identification of three distinct peroxisomal protein import defects in patients with peroxisome biogenesis disorders. *J Cell Sci* 108, 1817-29.
- Smith, J. J. und Rachubinski, R. A. (2001). A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 276, 1618-25.
- Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Koller, A., Luers, G. H., Rangell, L., Keller, G. A. und Subramani, S. (1999a). Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* 10, 1745-61.
- Snyder, W. B., Koller, A., Choy, A. J., Johnson, M. A., Cregg, J. M., Rangell, L., Keller, G. A. und Subramani, S. (1999b). Pex17p is required for import of both peroxisome membrane and luminal proteins and interacts with Pex19p and the peroxisome targeting signal-receptor docking complex in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* 10, 4005-19.
- Snyder, W. B., Koller, A., Choy, A. J. und Subramani, S. (2000). The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* 149, 1171-8.
- Soukupova, M., Sprenger, C., Gorgas, K., Kunau, W. H. und Dodt, G. (1999). Identification and characterization of the human peroxin PEX3. *Eur J Cell Biol* 78, 357-74.
- South, S. T. und Gould, S. J. (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol* 144, 255-66.
- South, S. T., Sacksteder, K. A., Li, X., Liu, Y. und Gould, S. J. (2000). Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* 149, 1345-60.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5187-92.
- Subramani, S. (1993). Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9, 445-78.
- Subramani, S., Koller, A. und Snyder, W. B. (2000). Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem* 69, 399-418.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. und Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Embo J* 10, 3255-62.

- Szilard, R. K., Titorenko, V. I., Veenhuis, M. und Rachubinski, R. A. (1995). Pay32p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is an intraperoxisomal component of the matrix protein translocation machinery. *J Cell Biol* 131, 1453-69.
- Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T. und Fujiki, Y. (1998). A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 883-6.
- Terlecky, S. R., Nuttley, W. M. und Subramani, S. (1996). The cytosolic and membrane components required for peroxisomal protein import. *Experientia* 52, 1050-4.
- Terlecky, S. R., Wiemer, E. A., Nuttley, W. M., Walton, P. A. und Subramani, S. (1996). Signals, receptors und cytosolic factors involved in peroxisomal protein import. *Ann N Y Acad Sci* 804, 11-20.
- Titorenko, V. I., Ogrydziak, D. M. und Rachubinski, R. A. (1997). Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth und peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 17, 5210-26.
- Titorenko, V. I. und Rachubinski, R. A. (1998a). Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 2789-803.
- Titorenko, V. I. und Rachubinski, R. A. (1998b). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* 23, 231-3.
- Titorenko, V. I., Smith, J. J., Szilard, R. K. und Rachubinski, R. A. (1998). Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. *J Cell Biol* 142, 403-20.
- Titorenko, V. I., Chan, H. und Rachubinski, R. A. (2000). Fusion of small peroxisomal vesicles in vitro reconstructs an early step in the in vivo multistep peroxisome assembly pathway of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* 148, 29-44.
- Titorenko, V. I. und Rachubinski, R. A. (2000). Peroxisomal membrane fusion requires two AAA family ATPases, Pex1p und Pex6p. *J Cell Biol* 150, 881-6.
- Titorenko, V. I. und Rachubinski, R. A. (2001). The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 357-68.
- Tobias, J. W. und Varshavsky, A. (1991). Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266, 12021-8.
- Tolbert, N. E. (1981). Metabolic pathways in peroxisomes und glyoxysomes. *Annu Rev Biochem* 50, 133-57.

- van der Klei, I. J., Hilbrands, R. E., Kiel, J. A., Rasmussen, S. W., Cregg, J. M. und Veenhuis, M. (1998). The ubiquitin-conjugating enzyme Pex4p of *Hansenula polymorpha* is required for efficient functioning of the PTS1 import machinery. *Embo J* 17, 3608-18.
- Van der Leij, I., Franse, M. M., Elgersma, Y., Distel, B. und Tabak, H. F. (1993). PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11782-6.
- van Roermund, C. W., Hetteema, E. H., Kal, A. J., van den Berg, M., Tabak, H. F. und Wanders, R. J. (1998). Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *EMBO J*. 17, 657-661.
- van Roermund, C. W., Tabak, H. F., van Den Berg, M., Wanders, R. J. und Hetteema, E. H. (2000). Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150, 489-98.
- Varshavsky, A., Turner, G., Du, F. und Xie, Y. (2000). Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem* 381, 779-89.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. und Cook, W. J. (1987a). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194, 531-44.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., Wilkinson, K. D., Vierstra, R. D., Hatfield, P. M. und Cook, W. J. (1987b). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast und oat ubiquitin. *J Biol Chem* 262, 6396-9.
- Walton, P. A., Wendland, M., Subramani, S., Rachubinski, R. A. und Welch, W. J. (1994). Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J Cell Biol* 125, 1037-46.
- Walton, P. A., Hill, P. E. und Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* 6, 675-83.
- Wanders, R. J., Schutgens, R. B. und Barth, P. G. (1995). Peroxisomal disorders: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 726-39.
- Wanders, R. J. und Tager, J. M. (1998). Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol Aspects Med* 19, 69-154.
- Wiebel, F. F. und Kunau, W. H. (1992). The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Nature* 359, 73-6.

Wiemer, E. A., Nuttley, W. M., Bertolaet, B. L., Li, X., Francke, U., Wheelock, M. J., Anne, U. K., Johnson, K. R. und Subramani, S. (1995a). Human peroxisomal targeting signal-1 receptor restores peroxisomal protein import in cells from patients with fatal peroxisomal disorders. *J Cell Biol* 130, 51-65.

Wiemer, E. A., Terlecky, S. R., Nuttley, W. M. und Subramani, S. (1995b). Characterization of the yeast and human receptors for the carboxy-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 637-48.

Will, G. K., Soukupova, M., Hong, X., Erdmann, K. S., Kiel, J. A., Dodt, G., Kunau, W. H. und Erdmann, R. (1999). Identification and characterization of the human orthologue of yeast Pex14p. *Mol Cell Biol* 19, 2265-77.

Wittke, S., Lewke, N., Müller, S. und Johnsson, N. (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol Biol Cell* 10, 2519-30.

Wittke, S., Dünwald, M. und Johnsson, N. (2000). Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell* 11, 3859-71.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. und Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17, 3469-78.

Xie, Y. und Varshavsky, A. (1999). The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *Embo J* 18, 6832-44.

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die Forschungsmöglichkeiten, die vielfache Unterstützung und die Anregungen zu dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen danke ich für hilfreiche Diskussionen, die freundliche Überlassung von Hefestämmen und die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen. Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer möchte ich für die Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen, herzlich danken.

Ich bin allen zu Dank verpflichtet, die mir Material und technische Ratschläge zur Verfügung gestellt haben: Herrn Priv.-Doz. Dr. Norbert Lehming (Max-Delbrück-Laboratorium, Köln) sei für die Überlassung der Two-Hybrid-Klone, RGFP-Plasmide und einer NuI-Genbank gedankt, Herrn Dr. Christoph Reichel (Garching Pharmaceutical Company, Martinsried) für die Überlassung der NuI-Genbank, Frau Iris Ottenschläger (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) für Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie, Herrn Prof. Dr. Ben Distel, Herrn Dr. Ewald Hetteema und Frau Astrid Kragt, M. Sc. (Universiteit van Amsterdam, Niederlande) sowie Herrn Prof. Dr. Wolf-H. Kunau und Frau Dr. Garnet Will (Universität Bochum) für die Zusendung von Hefestämmen, Plasmiden und für technische Hilfestellung.

Meinen Kollegen im Max-Delbrück-Laboratorium möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung danken. Besonderer Dank geht an Dr. Nicole Lewke und Dr. Martin Dünnwald für ihre Freundschaft durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit und die hilfreichen Korrekturarbeiten bei der Erstellung dieser Arbeit. Katja Derkow (TU Dresden) sei für ihren großartigen Einsatz für dieses Projekt während ihres Praktikums gedankt.

Holger Hansen (Hansen & Gieraths EDV-VertriebsGmbH, Bonn) und Heike Grotegut (DV-Abteilung des MPIZ Köln) gebührt Dank für die Hilfe, diese Arbeit in die richtige „Form“ zu bringen.

Meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Verwandten und allen meinen Freunden danke ich für die Durchhalteparolen. Ohne Euch wäre diese Arbeit nie so weit gekommen!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jörg H. Eckert
Geburtsdatum 17. Mai 1971
Geburtsort München
Eltern Dörte Eckert, geb. Gunzer
BDir i. R. Dipl.-Ing Eberhard K. A. W. Eckert
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1977 – 1981 Montessori-Grundschule, Bonn
1981 – 1987 Amos-Comenius-Gymnasium, Bonn
1987 – 1988 Niceville Senior High School, Niceville, FL, USA
1988 – 1990 Amos-Comenius-Gymnasium, Bonn
Abschluß: Abitur

Wehrdienst

1990 – 1992 Soldat auf Zeit

Studium

1992 – 1995 Studium der Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
1995 – 1996 DAAD-Stipendiat an der University of New South Wales, Sydney, Australien; Studium der Biochemie und Molekulargenetik
1996 – 1997 Studium der Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium/ Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson und der Betreuung von Prof. Dr. Volker Herzog, Bonn und Priv.-Doz. Dr. Klaus Palme, Köln.
Titel: Untersuchungen zu einer neuen Methode zur Messung von Proteinfaltung *in vivo*.
1997 Abschluß: Diplom-Biologe
1998 – 2001 Promotionsstudium der Biologie, Universität zu Köln
Anfertigung der Doktorarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium/ Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, unter der Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson
2001 Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Erklärung

gemäß §3 Abs. 1, Punkt 10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Albertus-Magnus-Universität zu Köln:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson betreut worden.